





**Antimicrobial peptides and their use against plant pathogens.****Publication number:** JP5294995**Publication date:** 1993-11-09**Inventor:** KURAUDEIO MEIPIRII; KIYASARIN DAGASU DE  
ROBAATSU; GERARUDEIN FURANSHISU SUTAARU;  
NIYUUERU FURETSUDO BASUKOMU; MAIKERU  
DENISU SUUEDOROFU; JIYON AIRA UIRIAMUSU;  
NIKORASU POORU EBARETSUTO**Applicant:** DONEGANI GUIDO IST**Classification:****- international:** A61K38/00; A01N63/02; A61P31/04; A61P31/10;  
C07K7/00; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/00;  
C07K14/46; C07K19/00; C12N15/82; A61K38/00;  
A01N63/02; A61P31/00; C07K7/00; C07K14/00;  
C07K14/435; C07K19/00; C12N15/82; (IPC1-7):  
C07K7/10; A61K37/02; C07K7/08; C07K15/12;  
C07K99/00**- european:** A01N63/02; C07K7/06A; C07K7/08A; C07K14/46;  
C12N15/82C8B6A; C12N15/82C8B6B**Application number:** JP19920059848 19920131**Priority number(s):** US19910649784 19910201**Also published as:** EP0497366 (A2)  
 US5519115 (A)  
 EP0497366 (A3)  
 AU648140B (B)[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP5294995

Abstract of corresponding document: **EP0497366**

The present invention relates to several types of antimicrobial peptides including reverse antimicrobial peptides, antimicrobial oligopeptides and other antimicrobial compositions, such as cecropin P1. The present invention also relates to the use of these antimicrobial peptides to provide organisms, and, in particular, plants, with protection from microbial pathogens. Finally, the present invention relates to a screening method which may be useful for determining the phytotoxicity of an antimicrobial peptide.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-294995

(43)公開日 平成5年(1993)11月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 7/10	Z N A	8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A D Z	8314-4C		
C 0 7 K 7/08		8318-4H		
15/12		7731-4H		
// C 0 7 K 99:00				

審査請求 未請求 請求項の数60(全 65 頁)

(21)出願番号 特願平4-59848

(22)出願日 平成4年(1992)1月31日

(31)優先権主張番号 0 7 / 6 4 9 7 8 4

(32)優先日 1991年2月1日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591237939

イスチテュート グイド ドネガニ ソシ

エタ ベル アチオニ

イタリア 28100 ノヴァラ ヴィア フ

ァウセル 4

(72)発明者 クラウディオ メイビリィ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州

08540プリンストン デルメラードライ

ヴ 107

(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗菌性反転ペプチド、抗菌性オリゴペプチド及び他の抗菌性組成物、及びそれらの製造法ならびにそれらの使用法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 少くとも一つの微生物病原体特に少くとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ、抗菌性反転ペプチド(reverse antimicrobial peptides)組成物を提供する。

【構成】 抗菌性反転ペプチド、抗菌性オリゴペプチド及び他の抗菌性組成物たとえばセクロビンP1を包含する抗菌性ペプチド。微生物病原体からの保護を生物、特に植物に与えるために、これら抗菌性ペプチドを用いる方法。また、抗菌性ペプチドの植物毒性を測定するために有用なスクリーニング方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記モノマーの夫々がN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマーはそのC末端で上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端にペプチド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよいオリゴペプチド。

【請求項2】 少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記ペプチドの夫々がN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーはジスルフィド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよいオリゴペプチド。

【請求項3】 上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーが結合されているところの末端の少くとも一つにペプチド結合により結合されている少くとも一つの別のペプチドを更に含む請求項2記載のオリゴペプチド。

【請求項4】 少くとも一つのペプチドサブユニットを上記ジスルフィド結合から隔てる少くとも一つのブリッジを更に含む請求項2記載のオリゴペプチド。

【請求項5】 上記ペプチドモノマーの少くとも一つが、そのN又はC末端以外でCysにより置換されている請求項2記載のオリゴペプチド。

【請求項6】 上記ペプチドモノマーの少くとも一つがその末端の一つにCysを有する請求項2記載のオリゴペプチド。

【請求項7】 少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記ペプチドモノマーの夫々がN末端及びC末端、及び少くとも一つのアミノ酸を含む一つのブリッジを含み、上記少くとも一つのブリッジはN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つのブリッジのN末端は上記少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端にペプチド

結合により結合され、上記少くとも一つのブリッジのC末端は上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端にペプチド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第二のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよく、但し、上記オリゴペプチドがマガイニンPre-pro蛋白質の構造を持たないオリゴペプチド。

【請求項8】 上記ペプチドサブユニットを上記ブリッジに結合するペプチド結合の少くとも一つを横切るジスルフィド結合、又はブリッジをそれ自体に結合するジスルフィド結合を更に含む請求項7記載のオリゴペプチド。

【請求項9】 上記少くとも一つのブリッジが約1〜約100のアミノ酸を含む請求項7記載のオリゴペプチド。

【請求項10】 上記少くとも一つのブリッジが約1〜約20のアミノ酸を含む請求項8記載のオリゴペプチド。

【請求項11】 上記ブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValの群から選ばれる単一アミノ酸である請求項10記載のオリゴペプチド。

【請求項12】 上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValから選ばれる請求項11記載のオリゴペプチド。

【請求項13】 上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValから成る群から選ばれた2〜5のアミノ酸を含む請求項10記載のオリゴペプチド。

【請求項14】 上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Lys, His, Pro, Ser, Thr, Tyr, 及びValから成る群から選ばれたアミノ酸より成る請求項13記載のオリゴペプチド。

【請求項15】 上記少くとも一つのブリッジが(SEQ ID No. 5)の構造を持ち、ここでXaa<sup>1</sup>〜Xaa<sup>5</sup>は夫々、Gly, Ala, His, Ser, Arg, 及びProより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項14記載のオリゴペプチド。

【請求項16】 Xaa<sup>1</sup>〜Xaa<sup>5</sup>が夫々Glyであ

る請求項15記載のオリゴペプチド。

【請求項17】 上記少くとも一つのブリッジがオメガループである請求項7記載のオリゴペプチド。

【請求項18】 上記少くとも一つのブリッジがトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメインである請求項7記載のオリゴペプチド。

【請求項19】 上記少くとも一つのブリッジがベータターンである請求項7記載のオリゴペプチド。

【請求項20】 上記ペプチドモノマーの少くとも一つが、植物病原体に対して活性を抗菌性ペプチドである請求項1、2又は7記載のオリゴペプチド。

【請求項21】 約2〜約16のペプチドモノマーを含む請求項20記載のオリゴペプチド。

【請求項22】 上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーが少くとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドであり、かつ (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、(SEQ ID No. 6)、(SEQ ID No. 7)、(SEQ ID No. 8)、(SEQ ID No. 9)、(SEQ ID No. 10)、(SEQ ID No. 13)、(SEQ ID No. 15)、及び上記ペプチドの単一残基欠如誘導体、上記ペプチドの複数残基欠如誘導体、上記ペプチドの単一残基置換誘導体、上記ペプチドの複数残基置換誘導体、又は上記ペプチドの単一残基末端付加誘導体より成る群から選ばれた上記ペプチドの機能的誘導体より成る群から選ばれる請求項21記載のオリゴペプチド。

【請求項23】 C末端アミドを更に含む請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項24】 上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーの少くとも一つが、(SEQ ID No. 1)及び(SEQ ID No. 2)より成る群から選ばれた構造を持つペプチドの複数残基置換誘導体であり、かつペプチド構造 (SEQ ID No. 3) [ここでXaa<sup>5</sup>、Xaa<sup>6</sup>、Xaa<sup>7</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>10</sup>、Xaa<sup>11</sup>、Xaa<sup>12</sup>、Xaa<sup>13</sup>、Xaa<sup>16</sup>、Xaa<sup>19</sup>、Xaa<sup>21</sup>、Xaa<sup>22</sup>、及びXaa<sup>23</sup>は、互に同じでも異ってもよく、Ala、Arg、Cys、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValから成る群から選ばれる]を有する請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項25】 Xaa<sup>5</sup>はPhe、Cys、Ile、Leu、Trp及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はAsn、Ile、Cys、及びLeuより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>7</sup>は、Phe、Ala、Cys、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr、Gln、Pro、Lys、As

n、Glu、His、Asp、及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>はAla、Cys、Met、Pro、Thr、Ser、Trp、Tyr、Gln、Lys、Asn、Glu、His、Asp、及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>10</sup>はGly、Lys、Leu、Ile、Val、Ala、Phe、Met、Thr、Ser、Trp、Tyr、Gln、Lys、Asn、Glu、His、Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup>はMet、Cys、Trp、Tyr、Gln、Lys、His、Pro、Ser、及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup>は、Phe、Cys、Ile、Trp、Leu及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup>はLeu、Ile、Cys、Trp、Phe、Val、Ala、Gly、及びProから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup>はThr、Cys、Trp、Tyr、Asp、Glu、Lys、Arg、Gln、His、Met、Ala、Gly、及びProから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup>はCys、Ala、Glu、Gln、His、Met、Pro及びTrpから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>21</sup>及びXaa<sup>23</sup>は同じでも異ってもよく、Arg、Asp、Cys、His、Glu、Lys、Gln、Tyr、Thr、Trp、Met、Ser、Ala、Phe、Val、Ile、Leu、及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>22</sup>はCys、Arg、Asp、His、Glu、Gly、Lys、Gln、Tyr、Trp、Met、Asn、Ala、Pro、Ser、及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項24記載のオリゴペプチド。

【請求項26】 植物病原体に対して活性な上記抗菌性ペプチドが、少くとも一つの植物プロテアーゼによる滅成に抵抗性である請求項24記載のオリゴペプチド。

【請求項27】 Xaa<sup>7</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>21</sup>、Xaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>より選ばれた基の少くとも一つが置換されている請求項26記載のオリゴペプチド。

【請求項28】 Xaa<sup>7</sup>がPhe、Ala、His、Lys、Glu、Asp、Ser、及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>がThr、Asp、His、Ser、Ala、及びGluより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>21</sup>がArg、Lys、His、Gln、Trp、Tyr、Thr、Ala、Leu、Ile、Val、Phe、Glu、Asp、及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>22</sup>がArg、Lys、Asn、His、Gln、Trp、Tyr、Ser、Thr、Pro、Cys、Ala、Gly、Glu、Asp、及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>23</sup>がSer、Pro、Leu、Cys、Val、Ile及



びTrpより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項27記載のオリゴペプチド。

【請求項29】 上記少くとも一つの第一のペプチド及び上記少くとも一つの第二のペプチドが、(SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、(SEQ ID No. 7)、及び(SEQ ID No. 6)より成る群及びその機能的誘導体から選ばれる請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項30】 (SEQ ID No. 3)にペプチド結合された(SEQ ID No. 6)、(SEQ ID No. 6)にペプチド結合された(SEQ ID No. 3)、ブリッジに結合された(SEQ ID No. 6)ペプチド、但しここでブリッジもまた(SEQ ID No. 3)にペプチド結合されている、又はブリッジにペプチド結合された(SEQ ID No. 3)、但しここでブリッジもまた(SEQ ID No. 6)にペプチド結合されている、及びこれらの機能的誘導体より成る群から選ばれた構造を持つ請求項24記載のオリゴペプチド。

【請求項31】 上記オリゴペプチドのN末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項20記載のオリゴペプチド。

【請求項32】 上記オリゴペプチドのN末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項33】 (SEQ ID No. 7)のアミノ酸構造を持つペプチド及びその機能的誘導体を含む組成物。

【請求項34】 (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 9)、(SEQ ID No. 10)、(SEQ ID No. 3)、及び(SEQ ID No. 2)、より成る群から選ばれたアミノ酸構造をペプチドの単一残基置換誘導体を含み、上記ペプチドは単一のCysで置換されているか、又はそのNまたはC末端の一方に付属する単一Cysを有するところの組成物。

【請求項35】 少くとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチドであるペプチドを含む組成物。

【請求項36】 少くとも一つの微生物病原体に対して活性な上記抗菌性反転ペプチドが、少くとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である請求項35記載の組成物。

【請求項37】 上記ペプチドが(SEQ ID No. 9)及びその機能的誘導体のアミノ酸構造を持つ請求項36記載の組成物。

【請求項38】 上記ペプチドが(SEQ ID No. 10)及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を有する請求項36記載の組成物。

【請求項39】 上記ペプチドが(SEQ ID N 50

o. 11)のアミノ酸構造を有し、ここでXaa<sup>1</sup>、Xaa<sup>2</sup>、Xaa<sup>3</sup>、Xaa<sup>5</sup>、Xaa<sup>6</sup>、Xaa<sup>11</sup>、Xaa<sup>12</sup>、Xaa<sup>13</sup>、Xaa<sup>14</sup>、Xaa<sup>16</sup>、Xaa<sup>17</sup>、Xaa<sup>18</sup>、及びXaa<sup>19</sup>は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValより成る群から選ばれる請求項36記載の組成物。

【請求項40】 上記ペプチドが(SEQ ID No. 11)のアミノ酸構造を持ち、ここでXaa<sup>1</sup>及びXaa<sup>3</sup>は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu, 及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup>はArg, Asp, Cys, His, Glu, Ser, Gly, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro, 及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はAla, Cys, Pro, Gln, Glu, His, Met, 及びTrpより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>9</sup>はThr, Trp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala, Cys, Pro, 及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup>はLeu, Ile, Cys, Pro, Trp, Phe, Val, Ala, 及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup>はPhe, Ile, Trp, Leu, Cys, 及びValより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup>はMet, Trp, Tyr, Cys, Gln, Lys, His, Pro, Ser, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup>はGly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Cys, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup>はAla, Met, Thr, Pro, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>17</sup>はPhe, Ala, Met, Pro, Cys, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup>はAsn, Ile, Cys, Pro及びLeuより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup>はPhe, Cys, Ile, Leu, Trp及びValより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項39記載の組成物。

【請求項41】 ペプチド結合によりN末端に結合された単一アミノ酸である単一残基N末端付加を更に含む請求項40記載の組成物。

【請求項42】 上記ペプチドが (SEQ ID No. 12) のアミノ酸配列を有し、ここでXaa<sup>1</sup>はSer、Cys及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup>はCys、Lys、His、Arg及びAsnより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>3</sup>はCys、Gly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>4</sup>はCys、Gly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>5</sup>はCys、Ser、Ala、Glu及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>6</sup>はCys、His、Lys、Arg及びPheより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項36記載の組成物。

【請求項43】 上記ペプチドが (SEQ ID No. 13) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項36記載の組成物。

【請求項44】 上記ペプチドが (SEQ ID No. 14) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項36記載の組成物。

【請求項45】 上記ペプチドが (SEQ ID No. 15) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項36記載の組成物。

【請求項46】 そのN末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項34又は36～45のいずれか1項記載の組成物。

【請求項47】 一つの群の病原体に対して比較的高活性であり、他の群の病原体に対して比較的低活性な少くとも一つの第一の抗菌性ペプチド、及び上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的不活性であるところの病原体の群に対して比較的高活性であり、かつ上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的高活性であるところの病原体の群に対して比較的不活性である少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドを含む抗菌性組成物。

【請求項48】 上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチド及び上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが植物病原体に対して活性である請求項47記載の抗菌性組成物。

【請求項49】 上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが植物病原性バクテリアに対して比較的高活性であり、かつ植物病原性真菌に対して比較的不活性であり、上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが植物病原性真菌に対して比較的高活性であり、かつ植物病原性バクテリアに対して比較的不活性である請求項48記載の抗菌性組成物。

【請求項50】 上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが (SEQ ID No. 6) ; (SEQ ID No. 3) ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>9</sup>はLys、Xaa<sup>10</sup>はLys、Xaa<sup>11</sup>はPhe、

Xaa<sup>12</sup>はAla、Xaa<sup>13</sup>はAla、Xaa<sup>14</sup>はIle、Xaa<sup>15</sup>はMet、Xaa<sup>16</sup>はAsn、そしてXaa<sup>17</sup>はSerである ; (SEQ ID No. 3) ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>9</sup>はLys、Xaa<sup>10</sup>はLys、Xaa<sup>11</sup>はPhe、Xaa<sup>12</sup>はAla、Xaa<sup>13</sup>はAla、Xaa<sup>14</sup>はIle、Xaa<sup>15</sup>はMet、Xaa<sup>16</sup>はAsn、そしてXaa<sup>17</sup>はSerであり、かつN末端Glyに結合されたMetペプチドを有する ; (SEQ ID No. 2) にペプチド結合された (SEQ ID No. 2) ; (SEQ ID No. 5) にペプチド結合された (SEQ ID No. 2) ; ここでXaa<sup>1</sup>～Xaa<sup>5</sup>は構造 (SEQ ID No. 2) の他のペプチドと同じく結合されているGlyである ; (SEQ ID No. 3) ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>9</sup>はLys、Xaa<sup>10</sup>はLys、Xaa<sup>11</sup>はPhe、Xaa<sup>12</sup>はAla、Xaa<sup>13</sup>はAla、Xaa<sup>14</sup>はIle、Xaa<sup>15</sup>はMet、Xaa<sup>16</sup>はAsnそしてXaa<sup>17</sup>はSerであるより成る群から選ばれた請求項49記載の抗菌性組成物。

【請求項51】 上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが (SEQ ID No. 1) 、 (SEQ ID No. 2) 、 N末端Glyにペプチド結合されたMetを持つ (SEQ ID No. 2) 、 位置21のMetが酸化されている (SEQ ID No. 2) 、 位置21のMetが除去されている (SEQ ID No. 1) 、 N末端Glyが除去され、かつ位置2のIleがMetで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置10のLysがHisで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置11のLysがHisで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置10及び11のLysが夫々His及びHisで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置8のSerがThrで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置8のSerがAlaで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置8のSerがGluで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 位置7のHisがPheで置き換えられている (SEQ ID No. 2) 、 夫々位置22及び23のAsn及びSerが除去されている (SEQ ID No. 2) 、 位置10のGlyがHisで置き換えられている (SEQ ID No. 1) 、 N末端Glyが除去されている (SEQ ID No. 2) 、 N末端Gly及び位置2のIleが除去されている (SEQ ID No. 1) 、 N末端Glyが除去されている (SEQ ID No. 1) 、 N末端Glyにペプチド結合されたMetを有する (SEQ I

D No. 1)、C末端Serが除去されている(SEQ ID No. 1)、C末端Ser及び位置22のLysが除去されている(SEQ ID No. 1)、位置22のLysがGlyで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、C末端Serが除去され、位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する(SEQ ID No. 1)、及び位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、位置23のSerがProで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する(SEQ ID No. 1)より成る群から選択される請求項4記載の抗菌性組成物。

【請求項52】 少くとも一つの微生物病原体に対して活性な少くとも一つの抗菌性ペプチドを用意する工程、但し、上記抗菌性ペプチドは、少くとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド、オリゴペプチド、P1、PGL<sup>+</sup>、セクロビンA、上記抗菌性ペプチドの機能的誘導体又はこれらの混合物より成る群から選ばれ、上記少くとも一つの抗菌性ペプチドは少くとも一つの微生物病原体を阻止するのに有効な量で用意されること；及び上記少くとも一つの微生物病原体を上記少くとも一つの抗菌性ペプチドと接触させる工程を含む、微生物病原体を阻止する方法。

【請求項53】 上記少くとも一つの抗菌性ペプチドが、少くとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である請求項52記載の方法。

【請求項54】 上記少くとも一つの抗菌性ペプチドが、植物組織の少くとも一表面に局所的施与により与えられる請求項53の方法。

【請求項55】 上記少くとも一つの抗菌性ペプチドがトランスジェニック植物における発現により用意される請求項53の方法。

【請求項56】 上記少くとも一つの抗菌性ペプチドが、トランスジェニック植物における発現、及び引続いた植物細胞間の細胞外空間への輸送により用意される請求項53記載の方法。

【請求項57】 抗菌性ペプチドの相対的毒性を測定するために抗菌性ペプチドをスクリーニングする方法において、少くとも一つの抗菌性ペプチドと、培養された全体細胞を含む溶液とも混合すること、及び上記培養された全体細胞による酵素消費の変化を測定することの工程を含む方法。

【請求項58】 上記培養された全体細胞が植物細胞である請求項57記載の方法。

【請求項59】 上記植物細胞がプロトプラストである請求項58記載の方法。

【請求項60】 アミノ酸構造(SEQ ID No. 3)を持つペプチド又はその機能的誘導体を含み、該ペプチドはそのN末端にペプチド結合で結合されたシグナ

ルペプチドを有し、但し上記ペプチドが(SEQ ID No. 1)又は(SEQ ID No. 2)の構造を持たない組成物。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は、病原体に対して活性な、抗菌性反転ペプチド(reverse antimicrobial peptides)を含む或る抗菌性組成物、抗菌性オリゴペプチド、抗菌性ペプチドの混合物を含む混合物、および病原体、特に植物病原体から保護するための該組成物の使用に関する。

【従来の技術】たとえば後天性ヒト免疫不全症候群(AIDS)、及びヒト免疫応答及び病原体防禦系を作用させる又は損う日より見病原体の感染により引き起される関連疾病のような状態を包含する、ヒト免疫応答及び病原体防禦系の構成及び機能について更に発見をなすことに、科学界のかなりの分野が取り組んでいる。この研究の一部として、基礎理論のモデルとして及び潜在的に移植可能性のある因子のソースとして他の生物の免疫は防禦系の生化学に多数の探求がなされてきた。そのような免疫又は防禦因子の一群は、二つの研究者グループ、つまり一つはダットリー・ウィリアムズに指導されたグループ、もう一つはミハエル・ザスロフに指導されたグループによって1987に初めて報告された抗菌性ペプチドである。抗菌性を持つように見えるアフリカツメガエル、*Xenopus laevis*の皮膚内に含まれる腺により分泌される多数のペプチドを、これらグループは成功裡に特徴づけ、報告した。ギオバニニ(Giovanini)ら、「Biosynthesis and Degradation of Peptides Derived from *Xenopus laevis* Prohormones」、バイオケミストリージャーナル(Biochem. J.) 243、(1987)、113-120、及びザスロフ(Zaslouf)ら、「Magainins, a Class of Anti-Microbial peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, characterization of two active forms and partial cDNA Sequence of a precursor」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84、(1987)、5449-5453、及びテリー(Terry)ら、「The cDNA Sequence Coding for Prepro-PGS (Prepro-Magainins) and Aspects of the Processing of This Prepro-Polypeptide」J. Biol. Chemistry, 263、(1988)、5745-5751を参照されたい。これらの研究は、少しの術後処置で又は術後処置なしで傷回復の間にかなりの回復力及び感染しない能力をこのカ

エルの種が持つという観察によって、少くとも一部促進された。これらペプチドは、集散的にマガイニン (magainins) と呼ばれる。研究者が気付いているマガイニン及び他のクラスの抗生又は抗菌性ペプチド (たとえばセクロピン (cecropins)、デフェンシン (defensins)、サルコトキシン (sarcotoxins)、メリティン (melittins) など) に関する刊行された研究は、一般にヒト医薬関連健康技術に集中していた。しかしながら、例外としてジェインズ (Jaynes) らの二つの特許出願 (WO 89/04371 及び WO 88/00976) が挙げられ、これらは一般に、遺伝子的に病気抵抗を高められた植物に関する。ジェインズらは、抗菌性ペプチドのための表現しうる異種遺伝子を含む遺伝子的に軽質転換された植物が作られると、支持データなしに推定した。この方法で、植物が病気に対する抵抗を高めたと望まれる。しかしジェインズらによれば、約30未満の残基を持つペプチドたとえばメリティン、ボムビン (bombinin) 及びマガイニンは、作物保護分野での使用には好ましくない。他の人は、植物における抗菌性ペプチドの存在又は実際に植物病原菌から植物を保護するための抗菌性ペプチドの使用に関する情報を刊行した。EPO 0,299,828; P. カスチールズ (Castells) ら、「Apidaecins: Antibacterial Peptides From Honeybees」The EMBO J. 6, (1989), 2387-2391; F. エブラヒム-ネスバット (Ebrahim-Nesbat) ら「Cultivar-Related Differences in the Distribution of Cell-Wall-Bound Thionins in Compatible and Incompatible Interactions Between Barley and Powdery Mildew」Planta 179, (1989), 203-210 参照。この研究の殆んどは、基本的に全長の天然抗菌性ペプチドの、植物又は動物における同定及び使用に集中した。この研究に加えて、天然に生じるペプチドの多数のバリエーションが調べられた。詳しくは、種々の程度の活性を持つマガイニンに基づく誘導体の多数が作られ、調べられた。ジュレチック (Juretic) ら、「Magainin 2 Amide and Analogues, Antimicrobial Activity, Membrane Depolarization and Susceptibility of Proteolysis」Febs Lett. 249, (1989), 219-223; チェン (Chen) ら 1, 「Synthetic Magainin Analogues With Improved Antimicrobial Activity」Febs Lett. 236, (1988), 462-466; チェン (Chen) ら、米国特許出願 No. 280,363, 1988年12月6日出願; クエルボ (Cuervo) ら「Synthesis and Antimicrobial Activity of Magainin Alanine Substitution Analogs」Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium; Peptides: Chemistry, Structure and Biology (J. E. リビエル (Rivier) ら), (1990), pp. 124-126, ESCOM-Leiden 発行, Neth., クエルボら「The Magainins: Sequence Factors Relevant to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity」Peptide Research 1, (1988), 81-86; 国際特許出願 No. WO 88/06597; 及び日本国特開平1-299299 参照。これらは、マガイニン1及び2の完全単一残基欠落同族体を含み、マガイニン2のN末端欠落、ならびにマガイニン2の完全アラニン (Ala) 置換同族体及び抗菌及び又は抗ガン医薬として有用であるにも知れずかつ第5及び12位で置換されているマガイニン2同族体と選択する。このような研究のもう一つは、バスコム (Bascomb) らによって行われ、米国特許出願 No. 566,152 (1990年8月10日出願) に報告されている。バスコムらは、活性、少くとも一つの植物プロテアーゼに対する蛋白質分解感受性及び/又は植物毒性のために重要な天然マガイニン上の特定の位置を同定した。バスコムらはまた、戦略的アミノ酸置換及び/又はそれに関する削除を開発した。上記の努力は、完成とはほど遠い。抗菌性ペプチド構造を機能と関係づける最も単純なモデルについてさえ完全な解明をまだ与えていない。従って、抗菌性ペプチド及びその使用について更に研究する必要がある。更に、天然ペプチド構造のモデルを作ったバスコムらを含む人々によって提供された有望な情報に鑑み、天然に生じるペプチドの種々の変性形の効果の研究は、更なる研究のための有用なモデル及びまた植物及び動物微生物病原体と戦うための有用なペプチドを提供するかも知れない。本発明は、いくつかの発見に向けられている。第一に、本発明者は、或る新しいペプチド及び、少くとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少くとも一つの植物病原体に対して活性である抗菌性反転ペプチドを包含する、それらの機能性誘導体を同定した。本発明者らはまた、先に同定した化合物 (PGL<sup>\*</sup>) の非アミド形 (本明細書では PGL<sup>\*</sup> と云う) の有用性を発見した。本発明者らはまた、抗菌活性を持つオリゴペプチドを発見し、またこれらペプチド及びオリゴ

ペプチドならびにたとえばセクロピン (cecropin) P1 (これはブタ起源であって、こん虫起源でない) のようなペプチドが、単独で又は混合物に含有されて、植物病原体に対する保護を与えるのに有用である。これらペプチド又はそれらの機能的誘導体ペプチドは更に、低減された植物毒性、及び/又は蛋白質分解的減成に対する低減された感受性を有しうる。すなわち、これら化合物及びその或る混合物は、少くとも一つの植物病原体に対する保護を与えるのに有用であり、また実際に、動物及び食品でのより広い用途を持ちうる。

【発明が解決すべき課題】本発明の目的の一つは、抗菌性であり、かつ少くとも一つの病原体に対する保護を与える化合物を提供することである。本発明の他の目的は、少くとも一つの植物病原体に対して特に活性な抗菌性ペプチドを提供することである。本発明の更に他の目的は、蛋白質分解に対する低減された感受性及び/又は低減された植物毒性を更に有しうる、少くとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドを提供することである。本発明の別の目的は、生きた細胞の産生物として天然に表現されうる抗菌性ペプチドを提供することである。これら目的に従い、本発明の一面は、少くとも一つの微生物病原体特に少くとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ、抗菌性反転ペプチド (reverse antimicrobial peptides) として知られる新しいクラスの組成物を提供する。そのような組成物は、夫々、RAMPP及びRAMPPPと名付けられうる。この新しいクラスの組成物は、先に同定された天然マガイニン1ペプチド (SEQ ID No. 1) の正確に逆である (SEQ ID No. 9) の構造を持つペプチドを含む。このクラスの組成物の別の一員は、マガイニン2 (SEQ ID No. 2) と呼ばれる天然ペプチドの同じで、しかし逆の配列である (SEQ ID No. 10) の構造を持つペプチドである。反転構造の組成物は、1. チャイケン (Chaiken) ら、「Sequence Simplification and Randomization and the Design of Peptide Recognition Surfaces」Peptides: Chemistry and Biology, Proceedings of the 10th American Peptide Symposium, G. R. マーシャル (Marshall) 編, ESCOM, ライデン, オランダ (1988), 354-363に開示されている。これらのペプチドは認識表面を模倣するために用いられた。シャイ (Shai) ら、「Anti-Sense Peptide Recognition of Sense Peptides: Direct Quantitative Characterization With the R

ibonuclease S-Peptide System Using Analytical High-Performance Affinity Chromatography」Biochemistry (1987), 26, 669-675を参照されたい。また、D-アミノ酸含有エニアチン (抗菌性環状ペプチド) の反転構造が、M. M. シェミアキン (Shemyakin) ら「Topochemical Approach in Studies of the Structure-Activity Relation: Enantio-enantiatin B」Nature, Jan. 28, (1967), 412-413、及びM. M. シェミアキンら「Topochemical Investigations on Peptide Systems」Angew-Chem. Internat. Edit., 8, (1969), 492-499に報告されている。マガイニン1及び2がバスコムらにより初めて研究されたとき、これらペプチドは少くとも一つの植物病原性真菌に対する保護を与えることができ、かつ植物病原性バクテリアに対するある程度の保護を与えることができることが発見された。しかし、これら化合物は、植物、動物、食品などへの添加及び使用に関して重大な疑問を生じるいくつかの望ましくない特性を持つと見い出された。詳しくは、これらペプチドは、植物組織内に含まれる又は動物源から分離される酵素により著しく蛋白分解的減成を受けることが発見された。また、マガイニン2は、比較的高レベルの植物毒性を持つ。従って、植物へのそのような天然ペプチドの添加は、ホスト細胞の死を起しえた。最良でも、これらペプチドは、植物細胞がこれらを消化するので、保護を少ししか又は全く与えない。これら天然に生じるペプチドの欠点を直す試みにおいて、バスコムら (前出) は、マガイニン1及び2及び彼らがそれらから誘導した化合物の構造及び機能を広く研究した。変性されたマガイニンペプチドの植物毒性及び/又は蛋白分解的減成速度を低下し、かつ同時に少くとも一つの植物病原体に対する許容できる程度保護を維持するところの変性を同定した。バスコムらはまたこれらペプチドを、植物病原体に対する保護の提供を含む種々の分野により有用となす多数の変性を検討した。

【課題を解決するための手段】今般、天然に生じる抗菌性ペプチド内に含まれるアミノ酸の配列を、ペプチド結合の方向性を維持しながら、反転することによって、少くとも一つの微生物病原体及び特に少くとも一つの微生物性植物病原体に対する許容できる活性及び従って許容できる保護レベルが得られることが見い出された。また本発明者らは、PAMPP及び特にRAMPPPは更に、比較的低い植物毒性及び/又は蛋白分解的減成に対する低い感受性を持つことを見出した。即ち、これらペプチドは、植物又は動物に植物病原体に対する保護を

与えるために植物又は動物に用いる及び／又はそれらに添加するのに適する新規かつ重要なペプチドのクラスを表わす。見込みある他の反転ペプチドは、(SEQ ID No. 8)のアミノ酸構造を持ちかつC末端アミド形であるセクロピン(Cacropin) Aの反転である(SEQ ID No. 14)のアミノ酸構造を持つ。セクロピン及びその誘導体は、昆虫起源の活性組成物でありかつ、植物及び動物病原体に対して潜在的に有用なものとして同定されてきた。J. M. ジェインズ(Joynes)ら、「In Vitro Cytocidal Effect of Lytic Peptides on Several Transformed Mammalian Cell Lines」Peptide Res. 2, 1989, 157-160; J. M. ジェインズら「In Vitro Cytocidal Effect of Novel Lytic Peptides on Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi」FASEB J. 2, 1988, 2778-83; J. M. ジェインズら「Increasing Bacterial Resistance in Plants Utilizing Antibacterial Genes from Insects」Bioassays 6, (1987), 263-270; J. M. ジェインズら「Method for Introduction of Disease and Pest Resistance into Plants and Novel Genes Incorporated into Plants Which Code Therefor」WO 88/00976, 1988年2月11日、米国特許出願889, 225, 1986年7月25日; J. M. ジェインズら「Plants Genetically Enhanced for Disease Resistance」WO 89/04371, 1989年5月18日、米国特許出願115, 941, 1987年11月2日参照。しかし、本発明者らは、たとえばセクロピンA (SEQ ID No. 8) (C末端アミド形の)は非常に植物毒性であることを発見した。従って、そのアミノ酸配列の反転(SEQ ID No. 14)は、マガイニンに基づくペプチドの構造が反転されたときに見出されたのと同じ利点を提供するにちがいない。(SEQ ID No. 13)の構造を持つP1及び(SEQ ID No. 15)の構造を持つPGL<sup>+</sup>の抗菌性反転ペプチド及び同等のペプチドはまた、これら反転ペプチドの総ての機能的誘導体であると考えられる。本発明は、少くとも一つの微生物病原体に対する保護を与えるためにこれらペプチドを用いることを包含し、またこれら抗菌性反転ペプチドが標的にされ、たとえば培地又は植物組織中の植物細胞の間の細胞外空間に輸送されるのを可能に

するN末端に結合されたシグナルペプチドを含む反転ペプチドを包含する。上述の目的に従い、本発明の他の面は、(SEQ ID No. 7)の構造を持つ新規な群の化合物及びそれらの非アミド機能的誘導体を提供する。本発明者は、天然に生じるPGL<sup>+</sup>のアミド不含形(非アミド形はPGL<sup>+</sup>として本明細書に示される)が少くとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少くとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を有することを見出した。ウィリアムズ(Williams)ら、「Raman Spectroscopy of Synthetic Antimicrobial Frog Peptides Magainin 2a and PGL<sup>+</sup>」Biochemistry, 29, (1990), 4490-4496参照。更に別の本発明の一面に従い、本発明者は、そのN又はC末端を置換する又はこれに結合するのではなくて、その構造内で置換された孤立Cysを含む被置換ペプチドの新規なクラスを開発した。これらペプチドは、少くとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少くとも一つの微生物性植物病原体に対して活性を有し、本明細書で提供される特定のジスルフィド結合されたオリゴペプチドにおいて用いるのに理想的に適している。本発明の別の目的は、抗菌性であり、かつ少くとも一つの病原体に対する保護を与える化合物を提供することである。本発明の別の目的は、少くとも一つの植物病原体に対して特に活性な抗菌性ペプチドを提供することである。本発明の更に別の目的は、蛋白質分解に対する低減された感受性を更に持つであろう。少くとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドを提供することである。本発明の別の目的は、細胞内小室(subcellular compartments)及び特に培養細胞又は植物組織中の細胞間の細胞外空間に容易に排せつされうる組成物を提供することである。本発明の更に別の目的は、比較的長期間細胞間の細胞外空間で活性を保持するであろうペプチドを提供することである。本発明の別の目的は、複数の異なる抗菌性ペプチドのデリバリーのためのプリカーサーとして用いうるペプチドを提供することである。本発明の別の目的は、正常な細胞メカニズムにより容易に表現されるペプチドを提供することである。されら及び他の目的に従い、本発明の一つの面は、抗菌性オリゴペプチドである新規なクラスの化合物を提供することである。これら新規なペプチドは更に、蛋白分解的減成に対して低い感受性を有しうる。広い意味において、本発明のオリゴペプチドは、少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーとして少くとも二つのペプチドサブユニットを含む機能的蛋白質である。これら二つのペプチドモノマー、又は個々のオリゴペプチドを成す任意的な追加的ペプチドモノマーは、ペプチド結合により直接に、又はジスルフィド結合又は一以上のブリッジにより間接に相互接続される。レ



ーガン (Regan) 及び W. デグラド (Degrad o)、「Characterization of a Helical Protein Designed From First Principles」Science, 241, (1988), 976-978 及び チェン (Cheng) ら、前出 (非抗菌性ペプチドの二量体及び多量体を記載) 参照。また、本発明のオリゴマーは、少くとも一つのペプチドモノマーをジスルフィド結合に關与する Cys から隔てるために一以上のブリッジを用いることにより、又はペプチドユニットをブリッジに結合するペプチド結合の少くとも一つを横切るジスルフィド結合が形成するのを許すことにより、複数のブリッジ及びジスルフィド結合によって結合せらる。本発明に従い、オリゴペプチドを構成する個々のペプチドモノマーの夫々は一般に、微生物性病原体に対して活性でありかつ、より好ましくは、少くとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である、自体抗菌性のペプチドである。しかし、任意的なブリッジではなくてペプチドサブユニットの少くとも二つが少くとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少くとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ限り、ペプチドモノマーの夫々が単独でそのような活性を示す必要はない。得られるオリゴペプチドは自体、少くとも一つの微生物性病原体に対し、及びより好ましくは少くとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である。従って、二量体 (すなわち二つのペプチドサブユニットのみ) について、用いられた少くとも一つの第一の及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーの両者及び得られたオリゴペプチドは、少くとも一つの病原体に対し活性である。本発明の三量体は、少くとも一つの病原体に対し活性なペプチドサブユニットのみを含む必要はない。たとえば、残り二つのモノマーが少くとも一つの病原体に対して活性であり、かつ得られる三量体も少くとも一つの病原体に対して活性である限り、本発明の三量体オリゴペプチドの末端ペプチドモノマーの一つ又は中間のモノマーが、抗菌性を示さなくてもよい。本発明のオリゴペプチドは、驚くほど多数の形を取りうる。しかし、簡単のために、本発明のオリゴペプチドは、二量体すなわち介在するブリッジ有り又は無しで二つのペプチドより成るオリゴペプチドとして最良に概念化せらる。これらの最も単純なものは、少くとも一つの第一のペプチドモノマーと少くとも一つの第二のペプチドモノマーから成る、いわゆる頭尾オリゴペプチドである。各ペプチドモノマーは、N末端 (アミノ末端) 及びC末端 (カルボキシル末端) を有し、この両者はペプチド結合を形成しうる。頭尾構造において、少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端アミノ酸は、何らの介在するブリッジ基なしで、ペプチド結合により、少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接結合される。このタイプの頭尾ペプチドの例は、下記構造を持つオリゴペプチドである。(S

EQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 3) ここで Xaa<sup>5</sup> は Phe, Xaa<sup>6</sup> は Leu, Xaa<sup>7</sup> は His, Xaa<sup>8</sup> は Glu, Xaa<sup>10</sup> は Gly, Xaa<sup>11</sup> は Lys, Xaa<sup>12</sup> は Phe, Xaa<sup>13</sup> は Gly, Xaa<sup>14</sup> は Gly, Xaa<sup>15</sup> は Glu, Xaa<sup>16</sup> は Met, Xaa<sup>17</sup> は Lys そして Xaa<sup>18</sup> は Pro である (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 14); (SEQ ID NO. 13) - (SEQ ID NO. 9); (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 10); 及び (SEQ ID NO. 6) - (SEQ ID NO. 9)。上記例の総てにおいて、ハイフンは、ハイフンの左のペプチドモノマーのC末端アミノ酸とハイフンの右のペプチドモノマーのN末端アミノ酸の間の直接ペプチド結合を表す。上記例から容易に判るように、本発明のオリゴペプチドは、夫々が植物病原体に対し活性である同じペプチドモノマー (該ペプチドモノマーの塩基構造は類似し、しかしそれは互に相対的に置換されている)、RAMPPP、及び/又はその構造及び起源が大きく異なるペプチドモノマーから構成されることができる。本発明に従う別のタイプのオリゴペプチドは、いわゆるブリッジされたオリゴペプチドである。一実施態様において、これらオリゴペプチドは、上記のように少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーより成る。しかし、加えて、少くとも一つのアミノ酸から成る少くとも一つのブリッジが備えらる。ブリッジは、N末端及びC末端を持つ。結合されると、本発明のブリッジされたオリゴペプチドは、ブリッジのN末端に直接結合した少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端を有し、そしてブリッジのC末端は少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接結合される。そのようなオリゴペプチドの例として、下記が挙げられる。(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 3) ここで Xaa<sup>5</sup> は Phe, Xaa<sup>6</sup> は Leu, Xaa<sup>7</sup> は His, Xaa<sup>8</sup> は Glu, Xaa<sup>10</sup> は Gly, Xaa<sup>11</sup> は Lys, Xaa<sup>12</sup> は Phe, Xaa<sup>13</sup> は Gly, Xaa<sup>14</sup> は Gly, Xaa<sup>15</sup> は Glu, Xaa<sup>16</sup> は Met, Xaa<sup>17</sup> は Lys そして Xaa<sup>18</sup> は Pro である; (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 9) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 14); 及び (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 14)。上記例の総てにおいてブリッジ内に含まれるアミノ酸の五つ総てが Gly

である好ましい五員ブリッジ (SEQ ID NO. 5) が用いられる。他のブリッジ、たとえば長さにおいては好ましくは100以下のアミノ酸又はより好ましくは20以下のアミノ酸のオメガグループ又は他の構造もまた有用である。本発明の別の面において、ブリッジは、一つという少いアミノ酸を成してもよい。そのような場合のオリゴペプチドの例は、下記の通りである。(SEQ ID NO. 2) -Ala- (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 2) -Gly- (SEQ ID NO. 20); (SEQ ID NO. 10) -Ala- (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 9) -Gly- (SEQ ID NO. 14); (SEQ ID NO. 9) -Gly- (SEQ ID NO. 9); 及び (SEQ ID NO. 1) -Ala- (SEQ ID NO. 14)。しかし、本発明のオリゴペプチドがペプチド結合により結合されている必要はない。事実、それらは、ジスルフィド結合により結合されてよい。即ち、本発明の別の面において、オリゴペプチドは少なくとも一つの第一のペプチドモノマー及び少なくとも一つの第二のペプチドモノマーを含み、その夫々はN末端及びC末端を含む。そして、少なくとも一つの第一のペプチドモノマー及び少なくとも一つの第二のペプチドモノマーは、ジスルフィド結合により結合される。得られるオリゴペプチドは頭尾構造であり、それによって少なくとも一つの第一のペプチドのC末端はCysであり、少なくとも一つの第二のペプチドのN末端のCysにジスルフィド結合により結合される。これらオリゴペプチドはまた、本明細書で述べるように頭頭又は尾尾構造で結合されてもよい。あるいは、本発明のこの面に従うオリゴペプチドは、ペプチドモノマーの少なくとも一つがその末端でオリゴペプチドに結合されていないようにして結合されることができる。むしろ、本発明のこの面におけるオリゴペプチドは、その末端ではなくてCysにより置換された少なくとも一つのペプチドモノマーを用いる。すると、このCysは、第二のペプチドモノマーのN又はC末端に置換された又は結合されたCys (ブリッジのN又はC末端はCysにより置換された又はそれを結合されている)、又は第二のペプチドモノマーの末端以外で置換されたCysとジスルフィド結合を形成する。本発明の頭尾態様に従い有用な少なくとも一つの第一の及び第二のペプチドモノマーは、その末端の一つに結合された追加的Cysを持ってよく、たとえば (SEQ ID NO. 1) -Cys、又は一つの末端で置換されたCysを持ってよく、たとえば (SEQ ID NO. 3) であり、ここでXaa<sup>1</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はArg、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>18</sup>はGly、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はCysである。もし、

これら二つのペプチドモノマーが夫々の末端でCysアミノ酸の間のジスルフィド結合により結合されていると、得られる構造は (SEQ ID NO. 1) -Cys-S-S- (SEQ ID NO. 3) \*と表わされることができ、ここで-S-Sは二つのCysの間の酸化されたジスルフィド結合を示し、\*はこのペプチドが、そのC末端が他のペプチドのC末端に向くように転倒されていることを示し、本例では\*により示された同じペプチドはC末端にCysを持つマガイニン1の複数残基置換である。これは、尾尾構造の例である。頭頭構造は、二つのペプチドモノマーのN末端でCysを置換し又は結合し、次にジスルフィド結合によりモノマーを結合することにより得ることができる。N末端に結合されたCysを持つペプチドモノマーの例は、Cys- (SEQ ID NO. 20) の構造 (ここでマガイニン1 (SEQ ID NO. 1) の位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGlnで置き換えられ位置23のSerがProで置き換えられている) の構造を持ち、ここでCysは位置1のGlyにペプチド結合される。本発明のこの面における頭尾オリゴペプチドは、構造 (SEQ ID NO. 1) -Cysのペプチドモノマーと、(SEQ ID NO. 20) (ここでN末端付加はCysである) の単一残基N末端付加誘導体である第二のペプチドモノマーの間にジスルフィド結合を形成することにより得られる。得られる構造は、(SEQ ID NO. 1) -Cys-S-S-Cys- (SEQ ID NO. 20) であろう。本発明者は更に、本発明に従うジスルフィド結合されたオリゴペプチドがまた、たとえばその末端以外で一つのアミノ酸Cysにより置換されたAMPPPである少なくとも一つのペプチドモノマーを用いて作ることができることを見出した。得られるオリゴペプチドの最も単純な形は、構造 (SEQ ID NO. 2) -Cys-S-S- (SEQ ID NO. 1) を持つ構造により示されることができ、ここでたとえばペプチド (SEQ ID NO. 1) 中の位置Xaa<sup>7</sup>に通常見られるHisはアミノ酸Cysで置き換えられる。すると、ジスルフィド結合は、二つのペプチドモノマー上のCys間で形成される。上記のいずれも、所望のように結合されることができ、得られるオリゴペプチドはかなりの数の繰返し単位で伸びることができる。たとえば、本発明のオリゴペプチドは、単一アミノ酸 (Ala) を持つブリッジにそのC末端Serでペプチド結合されている (SEQ ID NO. 2) の構造を持つ第二のペプチドのN末端に直接に、そのC末端でペプチド結合された構造 (SEQ ID NO. 1) を持つことができ、ここでAlaは (SEQ ID NO. 6) の構造を持つ第三のペプチドのN末端に結合され、この第三のペプチドのC末端は (SEQ ID NO. 12) (ここでXaa<sup>1</sup> = Ser、Xaa<sup>2</sup> = Lys、Xaa<sup>6</sup> = Gly、Xaa<sup>11</sup> =



21

=Ala, Xaa<sup>14</sup>=Gly, Xaa<sup>16</sup>=Glu, かつXaa<sup>17</sup>=Arg)の構造を持つ第四のペプチドのN末端に直接結合される。得られるペプチドの例は下記の通りである。(SEQ ID NO. 1)=(SEQ ID NO. 2)-Ala-(SEQ ID NO. 6)-(SEQ ID NO. 12)。本発明のオリゴペプチドの別の例は下記の通りである。(SEQ ID NO. 6)-(SEQ ID NO. 1)-Gly-(SEQ ID NO. 2)-(SEQ ID NO. 2)-(SEQ ID NO. 15)-(SEQ ID NO. 14)-Cys-S-S-(SEQ ID NO. 3)\*\*,\*。ここで\*で示されたペプチドモノマーは、この構造における順(尾尾構成)で左にそのC末端があるように転倒されており、(SEQ ID NO. 3)\*\*のXaa<sup>7</sup>はCysにより置換されており、(SEQ ID NO. 3)はXaa<sup>5</sup>=Phe, Xaa<sup>6</sup>=Leu, Xaa<sup>7</sup>=His, Xaa<sup>8</sup>=Glu, Xaa<sup>10</sup>=His, Xaa<sup>11</sup>=Lys, Xaa<sup>12</sup>=Phe, Xaa<sup>13</sup>=Gly, Xaa<sup>18</sup>=Gly, Xaa<sup>19</sup>=Glu, Xaa<sup>21</sup>=Met, Xaa<sup>22</sup>=Lys, 及びXaa<sup>23</sup>=Serを有し、-S-S-はジスルフィド結合を示す。オリゴペプチドの他の例は、下記である。(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 10)-(SEQ ID NO. 5)-(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 2)。ここで(SEQ ID NO. 5)のXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>5</sup>はGlyである;(SEQ ID NO. 6)-(SEQ ID NO. 7)-(SEQ ID NO. 4)-(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)\*-(SEQ ID NO. 4)\*-(SEQ ID NO. 7)\*-(SEQ ID NO. 6)\* (ここで(SEQ ID NO. 4)及び(SEQ ID NO. 4)\*のXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>4</sup>はGlyである;及びMet (SEQ ID NO. 10)-Cys-S-S-(SEQ ID NO. 2)。ここで(SEQ ID NO. 2)の位置7のHisはArgで置換されている。本発明のこの面における別の実施態様において、種々の形のブリッジがジスルフィド結合により結合されて、複合ブリッジ化分子を作ってもよい。得られるオリゴペプチドは、ここで述べたジスルフィド結合されたオリゴペプチドと本質的に同じである。しかし、それらは更に、一以上のペプチドサブユニットをジスルフィド結合から隔てるブリッジを含む。このような構造の一例は、(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 5)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 2)但し(SEQ ID NO. 5)のXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>5</sup>はGlyである、の構造を持つオリゴペプチドである。もし得られるオリゴペプチドが頭尾なら、C

22

ysに結合される(SEQ ID NO. 2)の残基はGlyである。もし得られるオリゴペプチドが尾尾なら、Cysに結合される残基はSerであり、ジスルフィド結合の左のペプチド構造は(SEQ ID NO. 2)\*と表わされる。このオリゴペプチドにおいて、五つのGly残基のブリッジは追加的なスペースを提供し、更なるフレキシビリティ及びモノマー間相互作用を可能にし、同時にジスルフィド結合により種々のモノマーを結合する能力を与える。本発明のより好ましい面において、複合ブリッジは構造(SEQ ID NO. 5)-Cys-S-S-Cys-Ala-, ここで(SEQ ID NO. 5)のXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>5</sup>はGlyである、を持つ。この構造は、ジスルフィド結合により隔てられた二つのブリッジを含む複合ブリッジを用いる。別の態様において、ブリッジとジスルフィド結合の組合せは、独特なオリゴペプチドを与えるために用いられる。本発明のこの面において、ここで記載するようなブリッジされたオリゴペプチドは、二つのペプチドモノマーか又は一つのペプチドモノマーと一つのブリッジを含み、これらは単一Cysにより置換されており、あるいはブリッジは二つのCysを含む。ジスルフィド結合は、ジスルフィド結合がまた、Cys含有モノマーをブリッジに結合する又は全体的にブリッジ内にあるペプチド結合の一つを横切るように、Cysアミノ酸間に形成されてよい。そのような得られるオリゴペプチドの一つはたとえば、構造(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 4)-(SEQ ID NO. 2)を持ち、ここで構造(SEQ ID NO. 1)を持つペプチドの位置21に通常見られるアミノ酸MetはCysで置換されており、(SEQ ID NO. 4)中でXaa<sup>1</sup>はGly, Xaa<sup>2</sup>はCys, Xaa<sup>3</sup>はGly, Xaa<sup>4</sup>はGlyであり、ジスルフィド結合は二つのCysアミノ酸の間に形成される。同様に、得られるオリゴペプチドの例は、(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 4)-(SEQ ID NO. 2)の構造を持ち、ここで構造(SEQ ID NO. 1)を持つペプチドの位置21に通常見られるアミノ酸MetはCysで置換されており、(SEQ ID NO. 4)中でXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>4</sup>はGlyであり、(SEQ ID NO. 2)の構造を持つペプチドの位置2に通常見られるアミノ酸IleはCysで置換されており、ジスルフィド結合は二つのCysアミノ酸の間に形成される。オリゴペプチドの別の例は、構造(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 15)-(SEQ ID NO. 2)を持ち、ここで(SEQ ID NO. 4)についてXaa<sup>1</sup>はCys, Xaa<sup>2</sup>はGly, Xaa<sup>3</sup>はPro, Xaa<sup>4</sup>はCysであり、ジスルフィド結合はブリッジ内の二つのCys間に形成される。ムター(Mutter), "The Construction of New Protein

s and Enzymes -- A Prospect for the Future?」Argew. Chem. Int. Ed. Engl., 24, (1985), 639-653 参照。本発明の別の面に従い、そのN末端にシグナルペプチドを付着させたオリゴペプチドが提供され、これはそれによって、本明細書記載のオリゴペプチドをオリゴペプチド産生のリボソーム部位から細胞間の細胞外空間へと輸送するのを促進し、従って得られるオリゴペプチドは少なくとも一つの微生物病原体による侵入に対する保護を与えるのにより有効でありうる。本発明はまた、病原性微生物の攻撃、移転増殖又は感染の悪影響から生物及び好ましくは植物を保護するために、本明細書記載のオリゴペプチドを用いる技術を含む。本発明の別の目的は、植物病原体を含む病原体に対する高められた活性を持つ化合物を提供することである。本発明の他の目的は、組成物の一成分により提供されうるよりも広い範囲の可能性ある微生物保護を示す組成物を提供することである。本発明のこの面において、二以上の別個の抗菌性ペプチドの混合物を含む新規化合物が提供される。このような抗菌性組成物の一つは、一つの群の病原体に対して比較的活性であり、他の群の病原体に対して比較的活性な少くとも一つの第一の抗菌性ペプチド、及び上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的活性であるところの病原体の群に対して比較的活性であり、かつ上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的活性であるところの病原体の群に対して比較的活性である少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドを含む。本発明者は、特定の抗菌活性、蛋白分解的減成及び／又はペプチドの植物毒性の低減を与えるために、上記のバスコムらの適用に従ってマガイニン1及び2を変性（修飾）するにおいて、マガイニンに構造的に係るペプチドの活性に或る犠牲が時に生じることを発見した。すなわち、たとえば、得られたペプチドは、低減された植物毒性又は蛋白分解的減成に対する高められた抵抗、又はこの両者を持つことができ、かつ特定の病原体又は特定のクラスの病原体に対してなおも活性でありうる。しかし、しばしば、これら改良されたペプチドは、他の病原体に対する実質的な活性を失う。たとえば、本発明者は、位置8のSerをGlnで置換することによって（SEQ ID NO. 2）の構造を持つマガイニン2を修飾することにより、得られたペプチドは植物毒性における実質的低減及び蛋白分解程度における実質的低減を有する。P3フサリウム（Fusarium）のような植物病原性真菌の生長を禁止するのに必要な最小完全阻止濃度は、20～25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  へ高められる。しかし、エルウィニア カルトボラ（*Erwinia Carotovora*）のような植物病原性バクテリアに対する保護を与えるのに必要な組成物の最小完全阻止濃度は約40～50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  から150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  超

へと増大する。明らかに、この組成物は、その低減された植物毒性及び蛋白分解感受性の故に、大きな見込みがある。しかし、その使用は、他の植物病原体の顕著なクラス（すなわちバクテリア性病原体）に対するその不活性により幾分損なわれる。本発明者は、他のペプチドが、植物病原体に関し、対応するしかし相補的挙動を示すことを発見した。たとえば、上記のマガイニン2誘導体と違ってP1（SEQ ID NO. 6）はエルウィニア カルトボラ カルトボラに対して非常に活性であり、しかしP3フサリウムに対して比較的不活性であることを、本発明者は見出した。そのような相補的ペプチドの二以上の混合物は、一つの抗菌性ペプチド単独の使用により実現できない広いスペクトルの保護を与えることができる。さらに、これらペプチドは植物細胞ホストの生育性を阻害せず、かつ少くとも一つの植物プロテアーゼの存在下で不必要に短いライフスパンの欠点を有さない。これら化合物は、植物病原性真菌及びバクテリアに対する広いスペクトルの活性を持ち、同時に低減された植物毒性及び蛋白分解に対する増大された総体的抵抗を持つ混合物として提供されうる。これら混合物は、二以上の抗菌性ペプチドを作り、集めそして混合することにより、及び／又は形質転換されたホスト細胞中でこれらペプチドを同時表現するように一又は複数の遺伝子を操作することにより提供されうる。また、これらペプチドは、本明細書記載のようにリンクされてオリゴペプチドを形成し、次にたとえば植物内に含まれる蛋白分解酵素により開裂されることができる。これは、二つの相補的抗菌性ペプチドの混合物のインサイツ形成を結果する。本発明の他の目的は、抗菌性ペプチドの相対的毒性を測定するために抗菌性ペプチドを簡便にスクリーニングする方法を提供することである。本発明の一面に従い、少くとも一つの抗菌性ペプチドと、培養された全体細胞を含む溶液とも混合すること、及び上記培養された全体細胞による酸素消費の変化を測定することの工程を含む、相対的毒性を測定するために、抗菌性ペプチドをスクリーニングする方法が提供される。培養された全体細胞により消費される酸素の抑制の程度は、培養された細胞と一般の細胞の両者に対する、ペプチドの相対的毒性の指標である。このスクリーニング法に従う好ましい実施態様において、培養された全体植物細胞が用いられる。本発明の別の好ましい実施態様において、植物細胞はプロトプラストである。本発明の好ましい実施態様を以下で説明する。本発明に従い用いられる種々のペプチドは、少くとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドである。しかし、本発明の好ましいペプチドは、AMPPPという言葉で表わされ、これはAnti microbial Peptide Active Against Plant Pathogenの略であり、本明細書で定義する如く、植物病原体に対する少くとも抗真菌及び／又は抗バクテリア活性を持つ蛋白質

又はペプチドである。本発明の目的のために好ましいこれら抗菌性ペプチド及び特にAMPPP組成物は、多数の基準の少くともいくつかを満たすようなものである。本発明に従うペプチド及びオリゴペプチドのための主な基準は、一以上の病原体及び特に植物病原体に対する活性である。即ち、これらペプチドは、好ましくは、植物病原体の生長を阻止しかつ／又は植物病原体の生存を制限するにおいて有効である。植物病原体という言葉は、植物に損傷及び／又は病気を起すことができる生物を包含し、真菌、原核生物（バクテリア及びマイコプラズマ）、ウイルス及びウイロイド、線虫、原生動物などを含む。たとえば、植物の病気を起しうる8000種以上の真菌がある。Plant Pathology, 第3版、George N. Agrios, Academic Press, Inc., 1988; A Literature Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, A. Y. Rossmanら、American Pathological Society, St. Paul, MN, 1988; The Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, N. W. Schadt, American Phytopathological Society, St. Paul MN, 1980参照。そのような病原体の広汎な列挙に照し、本発明の文脈において最も有用なAMPPPは、多数の植物病原体の生長又は生存を禁止する又は阻げる広いスペクトルの活性を持つ、又は特定の群の病原体、特に多くの作物に病気を起す群に対して極めて有効であるものである。たとえば、エルウィニア種は、1年に数10億ドルを農家に支出させる種々の腐敗病及びしおれ病に対して責任がある。従って、エルウィニア種の生存又は増殖を抑制できる一以上のAMPPPが望まれる。しかし、特定の種の真菌に対し及び／又は特定のホストを攻撃するのに加わるかも知れない他のクラスの病原体に対しある程度の活性をも備えるAMPPPがより望ましい。そのような状況の例はメイズにおける茎腐敗病であり、これはいくつかの種の真菌及びバクテリア（たとえばFusarium種、Gibberella種、Diplodia種、Macrophomina種、Pythium種、Cephalosporium種、Erwinia種、Pseudomonas種）の種々の組合せにより起される。他の例は、損傷した組織が植物生産物の収穫後の病気におけるように、腐生生物により浸入された状況である。多数の芝生の又は良性の微生物（それは主にバクテリア種である）が植物に関連して見られる。有用なAMPPPは、これら微生物の生存に影響を有さず、一以上の区別される植物病原体の有効的抑制を示すものである。従って、ある状況において、ある程度の特異性がある

利である。たとえば、根系の保護が望まれるとき、空气中窒素を固定するリゾビウム種のような生物又は根を或る病原体から保護するよう働くシュードモナス種のような根生生物を無傷のままに残すことが有利である。これら有益な又は良性の生物の多くはバクテリアであるので、バクテリアに対して低減された活性を持つAMPPPに特定の有用性がある。この言葉は抗菌性ペプチドの一以上の全類に広く適用されうるが、少くとも一つの病原体に対し活性な抗菌性ペプチド及び言葉「AMPPP」は下記を包含する：マガイニン1；マガイニン2；反転マガイニン；P1及び反転P1、PGL<sup>a</sup>及び反転PGL<sup>a</sup>；セクロピン（Cecropin）A、B及びDを含むセクロピン及びそれらの反転ペプチド、H. G. ボーマン（Boman）ら、「On the Primary Structures of Lysozymes, cecropins, and Attacins from Hyalophora ceropila」Developmental and Comparative Immunology, 9, (1985), 551-558参照；サルコトキシシン（Sarcotoxin）及びその反転ペプチド；ボンビニン（Bombinin）及びその反転ペプチド、A. クソーダス（Csordas）及びH. ミクル（Michl）、「Isolierung und Strukturufklarung eines Hamolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehsekret europaischer Unken」Monat. fur Chemie, 101 (1970), 182-189参照；XPF及びその反転ペプチド；チオニン（Thionin）及びその反転ペプチド；デフェンシン（Defensin）及びその反転ペプチド、H. ボーゲル（Vogel）ら、「The Structure of Melittin in Membranes」Biophys. J., 50, (1986), 573-582参照；メリチン（Melittin）及びその反転ペプチド、H. ボーゲルら、「The Structure of Melittin in Membranes」Biophys. J., 50, (1986), 573-582参照；及び他の同等のペプチド及びその機能性誘導体。本明細書で機能的誘導体という言葉は、単一残基欠如誘導体、複数残基欠如誘導体、単一残基置換誘導体、複数残基置換誘導体、単一残基末端付加誘導体、及びペプチドのC末端アミドを包含する。単一残基欠如誘導体という言葉は、特定に述べられたペプチドの残基の一つが欠如している他はそれと同じである又はこれに関係づけられる構造を持つ特定のペプチドを意味する。たとえば、[DES Met 21]MAG1は、その構造が（SEQ ID No. 1）により示されるマガイニン1の構造と同じペプチドであるが、N末端Glyに

対し21番目の位置に通常見られるMetが除去されている。(Desという表示は除去を示し、Metは除去されたアミノ酸を示し、21は除去されたMetが天然に生じるペプチドで占める位置を示し、MAG1はそのように変性されたペプチド(マガイニン1)を示す。)

得られる22のアミノ酸のペプチドは、ここで定義したように単一残基欠如誘導体である。同様に、複数残基欠如誘導体とは、さもなくば同一である又は関連づけられるところの配列から一より多いアミノ酸が除去されているペプチドを云う。たとえば(DES(Lys 2, Ser 23))MAG1は、(SEQ ID No. 1)により示されるマガイニン1と構造が同じペプチドであるが、位置23のC末端Ser及び位置22にある隣りのアミノ酸Lysが共に除去されている。得られる21のアミノ酸のペプチドは、本発明に従い複数残基欠如誘導体であり、より詳しくは二残基欠如誘導体である。本発明に従う単一残基置換誘導体とは、一つの残基が変えられていることを除いては同一である又は関連づけられる化合物の構造に同じであるペプチドを包含する。たとえば「Gln 8」MAG2は、(SEQ ID No. 2)により示されるマガイニン2と同じペプチドであるが、マガイニン2の位置8に通常見られるSerがGlnで置き換えられ、つまり置換されている。得られた23のアミノ酸のペプチドは、本発明に従い単一残基置換誘導体である。本発明に従う単一残基置換誘導体という言葉はまた、一つのCysアミノ酸で内部的に(すなわち末端ではなく、又はそれに付着されるのではなく)置換されたペプチドの群を包含する。そのような化合物の例は、[Cys 22]Mag2、[Cys 8]Mag1、[Cys 8]Mag2などである。同様に、本発明に従う複数残基置換誘導体とは、複数の置換がなされていることを除いては、特定の又は関連づけられるペプチドと同一のペプチドを云う。たとえば「Ala 13, 18」MAG1は、(SEQ ID No. 1)で示されるマガイニン1と同一のペプチドであるが、マガイニン1の位置13及び18に通常見られるGlyがAlaで置き換えられている。同様に、[Arg 7, Gln 8, Pro 23]MAG1(SEQ ID No. 20)は、位置7のHisがArgで置き換えられ、つまり置換され、位置8のSerがGlnで置き換えられ、位置23のSerがProで置換されていることを除き、マガイニン1に同一のペプチドである。得られたペプチドは、複数残基置換誘導体である。このタイプの他のペプチドは[Arg 7, Cys 8]MAG1である。これら誘導体は、排他的な変性ではない。すなわち、ペプチドは、置換及び欠如の両者の誘導体であることができる。たとえば「Des Gly 1, Met 2」MAG2は、(SEQ ID No. 2)を持つマガイニン2と同じ構造のペプチドであるが、N末端Glyが除去されており、かつN末端に対し

位置2に通常見られるIleがアミノ酸Metで置き換えられ、つまり置換されている。得られるペプチドは、本発明に従い単一残基欠如誘導体であり、かつ単一残基置換誘導体である。何らかの特定の欠如又は置換に限定されるものではないが、マガイニンに構造的に類似するペプチドのためのより好ましい置換のいくつかは、(SEQ ID No. 3)の構造を持つペプチドにより示される。この配列で用いられる「Xaa」は、可変物を示し、そこにアミノ酸の選択された群のいずれかが位置せらる。従って「Xaa<sup>n</sup>」は、可変物を示すのに用いられるのみでなく、その可変物の相対的位置又はその可変物が示すアミノ酸を表すためにも用いられる(すなわちnは、位置又は第n番の位置のアミノ酸を表す)。従って、Xaa<sup>n</sup>は、(SEQ ID No. 3)の構造を持つAMPPPの第6番の位置の可変物を示す。第n番の位置は、ペプチドのN末端(これらペプチドについては通常グリシン(Gly)である)に対する。上記のペプチドが(SEQ ID No. 3)の構造を持つペプチドのN末端アミノ酸(通常Gly)にペプチド結合により付着された単一残基N末端付加たとえばメチオニン(Met)又はN-ホルミル化Met「(f)Met」、Cys、His又はSerを含むときに、可変物Xaa<sup>n</sup>はその表記及びN末端に対する位置を保持する。これは、絶対的な意味において今や第6番の位置は得られたペプチドにおける第7番残基である事実には拘らずである。同様に、もしN末端Glyが欠如して、たとえば可変物Xaa<sup>n</sup>が得られたペプチドで第5番残基であるなら、しかしこの可変物はXaa<sup>n</sup>という表記のままである(すなわちIle Gly Lys Phe XaaについてXaaはなおもXaa<sup>n</sup>である)。そのような言葉で表わすと、マガイニン1はあるいは、(SEQ ID No. 3)(ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>及びXaa<sup>18</sup>はGly、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLys、そしてXaa<sup>23</sup>はSerである)の構造を持つペプチドとして表わすことができる。マガイニン2は、Xaa<sup>10</sup>がLysであり、Xaa<sup>22</sup>がAsnである点を除き、マガイニン1と構造的に類似である。図1において、本発明に従う好ましいペプチドのいくつかが一文字表現で示されている。この表現で用いられる「X」は可変物であり、上記のXaaと同じである。すなわち、図1の第3行(GIGKX……)における第5番の文字はXaa<sup>5</sup>に等しく、Xaa<sup>5</sup>と同じくアミノ酸で置き換えらる。第8行のC末端の「NH<sub>2</sub>」は、そこで示されるペプチドのC末端アミド形を示す。そのような修飾の利点の一つは、病原体に対して改善された活性を示す抗菌性ペプチド及び特にAMPPPの製造でありうる。本発明に従う好ましいペプチド組成物を

選択するため及び、実際に特定の変性を選択するの別の基準は、一以上のプロテアーゼ及び特に一以上の植物プロテアーゼ又は植物病原体プロテアーゼによる消化即ち滅成に対する抵抗である。植物は、細胞内、細胞内小器官内、小室内、又は細胞間の細胞外空間内に、蛋白質を滅成するのに用いられる酵素を含む。これら酵素（プロテアーゼとしても知られている）は、アミノ酸配列を結合している特定の結合を切り、不活性な又は低活性なフラグメントを作ることにより、蛋白質又はペプチドを滅成する。植物病原体もまた、多くの場合、抗菌性蛋白質又はペプチドを滅成しそしてたぶん不活性にすることができるプロテアーゼを作り分泌する。本発明の文脈において、この自然現象は、さもなければ植物病原体を阻止することによって植物を保護するであろうAMPPPを失活させるるので、不都合である。この問題は、細胞外空間に含まれるプロテアーゼに曝される典型的に適用されるAMPPP及び細胞内には細胞外プロテアーゼに曝される表現されたAMPPPの両者に生じる。天然のマガイニンにおけるXaa<sup>10</sup>-Xaa<sup>11</sup>位置の翻訳後開裂は、アフリカツメガエルの皮膚の浸出物に特有のプロテアーゼにより自然に引き起こされ、これはこの部位が消化のためにプロテアーゼにとって利用しうることを示している。M. G. ギオバニニら（前出）参照。一以上の植物プロテアーゼに感受性であると特性づけられるペプチド結合に隣接する部位における少くともいくつかのアミノ酸置換及び／又は欠如は、蛋白質分解を低減する又は除去するにちがいない。これは、プロテアーゼ酵素とAMPPP基質開裂部位の間の乏しい適合性の誘発による個々の植物プロテアーゼの作用の抑制に少くとも部分的に起因するであろう。植物プロテアーゼを含む植物細胞外液によるAMPPPの処理による植物蛋白分解的滅成は、マガイニン1及びマガイニン2の夫々位置7及び8のHisとSerの間、及び夫々マガイニン2及び1の位置21及び22のMetとAsn又はMetとLysの間の結合の開裂により起ることが、予期されず見いだされた。これら現象の認識において、植物プロテアーゼによる不都合な蛋白分解的滅成を大きく低減するのに有効な特定の置換が、これら位置の一以上で見いだされた。従って、そのように修飾されたペプチドは、突然変異植物における表現のための可能性ある候補であり、また作物保護のための慣用の適用のために有用でありうる。植物及び／又は植物病原体プロテアーゼによる不都合な蛋白分解的滅成を低減する（除去しないとしても）のに有効でありうる上記位置での置換は、下記を包含する。Xaa<sup>7</sup>におけるPhe, Ala, Glu, Asp, Lys, Ser, 又はArg, Xaa<sup>11</sup>におけるThr, Asp, Ala, His, 又はGlu, Xaa<sup>21</sup>におけるArg, Lys, His, Gln, Trp, Tyr, Thr, Val, Ala, Leu, Ile, Glu, Asp, 又はPhe, Xaa<sup>22</sup>における

Arg, His, Glu, Trp, Tyr, Thr, Ala, Cys, Lys, Gly, Asp, Asn, Pro又はMet, Xaa<sup>23</sup>におけるPro, Leu, Cys, Val, Ile, 又はTrp。本発明のこの面におけるより好ましい置換は、Xaa<sup>7</sup>におけるArg又はLys置換、Xaa<sup>8</sup>におけるGln置換及び／又はXaa<sup>23</sup>におけるProである。AMPPPにおける位置7、8、21又は22及び／又は23における好ましいアミノ酸置換のいずれか又は全部は、本発明に従う他の置換、欠如及び／又は延長と組み合わせられることができ、蛋白分解に抵抗性であるのみでなく、一以上の植物病原体に対する増大された活性、特定の植物病原体に対する選択された活性及び／又は低い植物毒性を持つペプチドを提供する。本明細書で、単一残基末端付加誘導体とはたとえば、C又はN末端に一つの追加的残基がペプチド結合により加えられたところの、(SEQ ID No. 1)の構造を持つマガイニン1のようなペプチドを云う。そのような単一残基末端付加誘導体の例は、マガイニン1分子のN末端にアミノ酸Metがペプチド結合されている[Met]MAG1、マガイニン1のN末端にホルミル化Metがペプチド結合されている[(f)Met]MAG1、及びマガイニン1のC末端SerにCysがペプチド結合されている[Cys 24]MAG1である。この言葉はまた、他の末端付加、たとえばN又はC末端に付着されたHis又はSerの使用をも包含する。上記のように、本発明で用いられるべき好ましい組成物を選択するための更に別の基準は、比較的低い細胞毒性及び植物においては植物毒性である。本発明の抗菌性ペプチドは、そのホスト細胞に対し、又は該ペプチドが適用される組織に対し比較的低い毒性を持たねばならない。AMPPPは好ましくは、植物細胞又は植物組織に対して相対的に最小の毒性挙動を示す。特に、抗菌性を増すよう又は蛋白分解的滅成への抵抗を増すデザインされた修飾は、植物毒性を実質的に増大してはならない。毒性挙動は、死、生長低下、空气中炭素の光固定の低下、栄養たとえば窒素又はリンの同化の低下、又は作物収量の低下により現わされる。従って、ホストと機能的に相容性であるペプチドを提供することが重要である。従って、一つのAMPPPを、他のAMPPPと、又は天然のマガイニン又は他の天然の抗生ペプチド又は工業的価値が実際にある又は見込める他の天然又は合成の抗生物質と比較するにおいて、植物毒性のいくつかの相対的指標が好まれる。そのような一つの指標は、正常な植物細胞小器官機能の抑制におけるAMPPPの可能性ある効果である。好ましい指標は、分離された植物葉緑体による酸素発生又は炭素固定又は分離された植物ミトコンドリアによる酵素吸吸、又は生きた細胞又は組織による酵素消費の抑制である。これら効果は、当業界で利用できる種々の手法及び装置、たとえばワーブルグ(Warburg)装置又は好ましくは

酸素電極によりモニターできる。「The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis」D. Walker, 1987, Hansatech Ltd., Kings Lynn, Norfolk, England 参照。

#### 反転ペプチド

RAMPPという言葉は、少なくとも一つの病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド (Reverse Antimicrobial Peptide active against at least one Pathogen) の略である。RAMPPPは、RAMP Pのサブセットであり、少なくとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド (Reverse Antimicrobial Peptides which are active against at least one Plant Pathogen) の略である。上述のように或る抗菌性ペプチドの配列を反転することにより、著しい利点を持つRAMPPPを作ることができる。詳しくは、RAMPP及び特にRAMPPPは、病原体及び特に少なくとも一つの植物病原体に対する抗菌活性を持つようである。更に、特定のペプチドの配列を反転することにより、対応する正常な「前進」配列の欠点のいくつかを持たない抗菌性ペプチドをうることができる。RAMPPPの文脈において、たとえば、対応する「前進」配列AMPPPに比べて、一つの植物プロテアーゼによる蛋白分解的減成を著しく受けない及び／又は植物毒性でないペプチドが得られる。従って、これらペプチドは、植物病原性真菌及び／又はバクテリアから植物を保護するのに用いる見込みある候補である。本発明に従い、同じであるが反転されたペプチド配列を持つRAMPPを作ることができ、例えば反転マガイニン1 (SEQ ID No. 9)、反転マガイニン2 (SEQ ID No. 10)、反転P1 (SEQ ID No. 13)、反転セクロビンA (SEQ ID No. 14)、ならびに反転PGL<sup>o</sup> (SEQ ID No. 7) 及び他のセクロビン、サルコトキシン、ボンビニン、XPF、チオキン、デフェンシン、メリティン、及び同様の抗菌性ペプチドの反転形である。本発明のRAMPPは、置換されていない天然に生じる抗菌性ペプチドを反転することに限定されない。適当な場合、或る置換、修飾及び／又は欠如がなされてよい。たとえば、(SEQ ID No. 11) を持つ反転ペプチドは、(SEQ ID No. 3) の構造を持つペプチドと同じであるが、正に反転した配列である；つまり、それらは、マガイニン1及び2に構造的に関連する化合物の反転ペプチドである。これらペプチドは位置Xaa<sup>1</sup> - Xaa<sup>3</sup>, Xaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>11</sup> - Xaa<sup>14</sup> 及びXaa<sup>16</sup> - Xaa<sup>19</sup> におい

て可変物を含み、ここでXaa<sup>1</sup>, Xaa<sup>2</sup>, Xaa<sup>3</sup>, Xaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>12</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>14</sup>, Xaa<sup>16</sup>, Xaa<sup>17</sup>, Xaa<sup>18</sup> 及びXaa<sup>19</sup> は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 及びValより成る群から選ばれる。好ましくは、(SEQ ID No. 11) のペプチドは天然のマガイニン1及び2に構造的に関連するRAMPPであり、ここでXaa<sup>1</sup> 及びXaa<sup>3</sup> は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup> はArg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro, 及びThr, より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>5</sup> はAla, Gln, Glu, His, Met及びTrpから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup> はTrp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala, 及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup> はLeu, Ile, Trp, Phe, Val, Ala及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup> はPhe, Ile, Trp, Leu及びValより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup> はMet, Trp, Tyr, Gln, Lys, His, Pro, Ser 及びArgより選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup> はGly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup> はAla, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>17</sup> はPhe, Ala, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup> はAsn, Ile及びLeuより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup> はPhe, Ile, Leu, Trp及びValより成る群から選ばれたアミノ酸である。本発明に従う他の置換されたRAMP Pとして、(SEQ ID No. 12) (ここでXaa<sup>1</sup> はSer, 及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup> はLys及びAsnより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup> はGly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup> はGly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup> はGly及びLysより成る群から選



ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1-6</sup>はSer、Ala、Glu及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>1-7</sup>はHis、Lys、Arg及びPheより成る群から選ばれたアミノ酸である)の構造を持つRAMPPが挙げられる。本発明の植物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド(RAMPPP)を包含するRAMPPは、一般にペプチドの化学的及び／又は遺伝子的合成に関して本明細書で述べられる手順に従って作ることができる。これらペプチドはまた、本発明に従いオリゴペプチド内に入れられることができる。また、本発明のオリゴペプチドの構造を全体に反転することが可能であり、かつ実際に有利でありうる。そうすることによって、反転ペプチドにより実現されると同様の利益を実現できる。また、これら反転ペプチドは、植物の根系に局所適用、注入、導入により、これら化合物を表現するであろう遺伝子を生成に入れそしてその表現を開始することにより、及び／又は同様のデリバリー法により、病原体に対して生物及び特に植物を保護するために、本明細書記載のように用いうる。

ペプチドモノマー

上記のペプチドモノマーならびに本明細書記載の他のものが、本発明に従うオリゴペプチドの構築に用いられる。これらオリゴペプチドは、ペプチドポリマーはコポリマーを構築するのに用いられるペプチドモノマーとして概念化される複数のペプチドサブユニットから形成される。従って本明細書において、ペプチドモノマー及びモノマーという言葉は、本発明のオリゴペプチドを構築するのに特に有用なペプチドを云う。オリゴペプチドの構築に有用な本発明のモノマーの一群は、上記のRAMPP及びRAMPPP、たとえば反転マガイニン1 (SEQ ID No. 9)、反転マガイニン2 (SEQ ID No. 10)、構造 (SEQ ID No. 12) を持つ反転マガイニン化合物、反転セクロビンA (SEQ ID No. 14)、反転PGL<sup>o</sup> (SEQ ID No. 15) 及び反転P1 (SEQ ID No. 13) である。本発明に従い有用な他のペプチドモノマーは、(SEQ ID No. 1) の構造を持つマガイニン1、(SEQ ID No. 2) の構造を持つマガイニン2、(SEQ ID No. 6) の構造を持つP1、(SEQ ID No. 7) の構造を持つPGL<sup>o</sup>、構造 (SEQ ID No. 8) のセクロビンAのようなセクロビン、サルコトキシン、ホンビン、XPF、チオニン、デフェンシン、メリティン及び同様の抗菌性ペプチドである。モノマー又はペプチドモノマーという言葉はまた、自体は抗菌性でないが、得られたオリゴペプチドの抗菌活性を高める、又はそれに他の利点を与えるペプチドを包含するものとして用いられる。たとえば、これらペプチドは、特に好ましいコンホメーション、アラインメント、特定の酵素に対する抵抗又は他の類似の利点を与える。また、単一残基欠如誘導体、

複数残基欠如誘導体、単一残基置換誘導体、複数残基置換誘導体、単一残基末端付加誘導体、及び適当な場合には直上で述べたペプチドのC末端アミドがまた、得られるペプチドアミドが得られるオリゴペプチドのC末端で用いられる限り、モノマーとして用いられうる。本発明でペプチドモノマーとして有用な特に好ましい単一残基末端付加誘導体は、本発明のペプチドのC又はN末端にペプチド結合されたCysの付加を含むもの、又は上記ペプチドのいずれかのN末端にペプチド結合されていてよいMet又は(f)Metの付加を含むペプチドモノマーである。本発明のこの面に従う他の置換は、これらペプチドのN又はC末端に付着されたSer又はHisを含む。構造(SEQ ID No. 3)(ここでXaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>10</sup>, Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>12</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>18</sup>, Xaa<sup>19</sup>, Xaa<sup>21</sup>, Xaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>は、互に同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValから成る群から選ばれるアミノ酸である)を持つペプチドの複数置換誘導体であるペプチドモノマーが、本発明で特に興味ある。好ましくは、これは可変物は、Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValより成る群のアミノ酸から選ばれる。より好ましくは、本発明のペプチドモノマーは、(SEQ ID No. 3)(ここでXaa<sup>5</sup>はPhe, Ile, Leu, Trp及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はAsn, Ile及びLeuから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>7</sup>は、Phe, Ala, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>はAla, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>10</sup>はGly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup>はMet, Trp, Tyr, Gln, Lys, His, Pro, Ser及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup>はPhe, Ile, Trp, Leu及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup>はLeu, Ile, Trp, Phe, Val, Ala及びGlyから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup>はThr, Trp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala及びGlyから成

る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 9</sup>はAla, Gly, Gln, His, Met, 及びTrpから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 1</sup>及びXaa<sup>2 3</sup>は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 2</sup>はCys, Arg, Asp, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro, 及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸である)の構造を持つペプチドを包含する。本発明に従い有用でありうる他のペプチドモノマーは、自体が少くとも一つの植物病原体による滅成に対し抵抗性であるものである。そのようなモノマーの一つはP1である。本発明者は、P1がAMPPPであることを見出した。すなわち、P1が少くとも一つの植物病原体に対し活性である化合物であることを本発明者は発見した。詳しくは、P1がエルウィニアカロトボラカロトボラのような植物病原性バクテリアに対して高度に活性であることを本発明者は見出した。本発明者はまた、P1が天然に生じる植物プロテアーゼによる消化に対して著しい抵抗を有し、かつ許容できるレベルの植物毒性を有することをも見出した。P1はセクロピンとして報告されているが、その起源(昆虫でなブタの腸)及びその異なる構造の故に別の分類が適当である。簡略化のために、本発明者は、この化合物を単にP1と表記することにした。リー(Lee)ら、「Antibacterial Peptides from Pig Intestines: Isolation of a Mammalian Cecropin」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, (1989) 9159-9162参照。植物プロテアーゼに抵抗する他のペプチドモノマーは、本発明に従うRAMPP及びRAMPPPならびに構造(SEQ ID No. 3)(ここでXaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>2 1</sup>, Xaa<sup>2 2</sup>及びXaa<sup>2 3</sup>から選ばれる基の少くとも一つは置換されている)のペプチドを包含する。好ましくは、Xaa<sup>1 1</sup>はPhe, Ala, His, Lys, Glu, Asp, Ser, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>がThr, Asp, His, Ser, Ala, 及びGluより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 1</sup>がArg, Lys, His, Gln, Trp, Tyr, Thr, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Glu, Asp, 及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 2</sup>がArg, Lys, Asn, His, Gln, Trp, Tyr, Ser, Thr, Pro, Cys, Ala, Gly, Glu, Asp, 及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>2 3</sup>がSer, Pro, Leu, Cys, Val, Ile,

及びTrpより成る群から選ばれたアミノ酸である。本発明のペプチドモノマーとして有用な特に好ましい単一又は二個残基欠如誘導体は、構造(SEQ ID No. 3)(ここでXaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>1 0</sup>, Xaa<sup>1 1</sup>, Xaa<sup>1 2</sup>, Xaa<sup>1 3</sup>, Xaa<sup>1 6</sup>, Xaa<sup>1 9</sup>, Xaa<sup>2 1</sup>, Xaa<sup>2 2</sup>, 及びXaa<sup>2 3</sup>は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, CrIu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValより成る群から選ばれる)を持つペプチドモノマーの単一及び二個残基欠如誘導体である。本発明の別の面に従い、モノマー及びペプチドモノマーは、N又はC末端以外で単一のCysにより置換されている、少くとも一つの病原体及び特に少くとも一つの植物病原体に対し活性な抗菌性ペプチドを包含する。これは、これらペプチドが他の位置で他のアミノ酸により置換されていない又は欠除を含まないと云うのではなく、得られる抗菌性ペプチドは一つの非末端Cysを含むと単に云っているのである。そのようなペプチドの例は、構造(SEQ ID No. 1)(ここで位置7に通常見られるHisはCysで置換されている)又は構造(SEQ ID No. 2)(ここで位置7のHisはArgで置換され、位置8に通常見られるSerはCysで置換されている)のペプチドである。本発明のこの面におけるモノマーは、マガイニン関連化合物に限定されず、P1、セクロピンA、PGL<sup>6</sup>など及び/又は上述のRAMPPPのような抗菌性ペプチドにCys置換を含むことができる。すなわち、たとえば、本発明のモノマーは、構造(SEQ ID No. 10)(ここでその第3番の位置に通常見られるMetはCysで置換されている)を持つペプチドを包含する。このペプチドはまた、付加がCysでない限りでN又はC末端付加を含むことができる。

#### 合成後修飾

上述したペプチド及びペプチドモノマーの種々の合成後修飾があり、これは一以上の病原体及び特に植物病原体に対するその有効性を改善できる。そのような合成後の修飾の一つは、本発明のAMPP、AMPPP、RAMPP、RAMPPP及びオリゴペプチドを含む種々のペプチドのカルボキシル末端のアミド化である。たとえばクエルボ等「The Magainins: Sequence Factors Relative to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity」Peptide Res. 1, (1988), 81-86参照。これらペプチドのアミド化は、一般にその抗菌活性を改善する。本発明のペプチド、ペプチドモノマー及びオリゴペプチドの他の合成後修飾は、抗菌活性、蛋白分解的滅成、及び/



又は植物毒性への抵抗に関して有利であると判る。このような修飾は、DNA配列から生物学的表現により作られたペプチド及び／又はペプチドモノマーの翻訳後修飾を含む。そのような翻訳後修飾は、アセチル化、ホスホリル化、グリコシル化、ファルネシル化、アミド化、チロシンスルホン化、化学的又は酵素的手段による酸化たとえばメチオニン残基の酸化、プロリン又はチロシンヒドロキシ化及び／又はプロリン異性化を含み、しかしこれらに限定されない。

#### オリゴペプチド

本発明のオリゴペプチドは、二以上のペプチドサブユニット又はペプチドモノマー、及び任意的に一以上のブリッジ及び／又はジスルフィド連結を含む蛋白質である。より詳しくは、本発明のオリゴペプチドは、ペプチド結合により直接に又はブリッジ化分子及び／又はジスルフィド連結の使用によって接続された少くとも二つのペプチドサブユニット又はペプチドモノマーを含む。本発明のオリゴペプチドの正確な性質及び作用の様式は完全には判っていない。しかし、これにより限定されるものではないが、これら化合物はペプチドモノマーの活性な集合体の形成を促進しうる。それらはまた、蛋白分解的減成に低感受性である又は低植物毒性である、又はこの両者である構造を作りうる。理論又はメカニズム、又はそれらの作動の後にある理論にかかわらず、本発明者は、本発明のオリゴペプチドが病原的微生物に対し及び特に微生物的植物病原体に対して、対応するモノマーと同等に又はそれ以上に活性であることを見出した。本発明に従う構造的に最も単純なオリゴペプチドは、いわゆる頭尾二量体オリゴペプチドである。これら二量体は、第一のペプチドモノマーのC末端残基が第二のペプチドモノマーのN末端位置のアミノ酸にペプチド結合で結合されるように、N及びC末端を持つ第一のペプチドモノマーとやはりN及びC末端を持つ第二のペプチドモノマーとの直接ペプチド結合を含む。これら頭尾二量体は、少くとも一つの病原体及びより好ましくは少くとも一つの植物病原体に対して活性である。この点で、頭尾二量体は、本明細書記載の他のオリゴペプチドと同じである。また、本発明に従い頭尾二量体を構造する二つのペプチドサブユニットの夫々は、自体単独で抗菌性である。すなわち、頭尾二量体オリゴペプチドで用いるべく選択されるペプチドモノマーは、抗菌性を欠くペプチドモノマーを含まない。本発明の好ましい頭尾二量体は、二つのサブユニット及び従って少くとも一つの第一の及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーが (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2) 又は (SEQ ID No. 3)、(SEQ ID No. 6) のどちらかの構造を持つところのものである。本発明の特に有利な頭尾二量体は、構造 (SEQ ID No. ) 及び (SEQ ID No. 6) を持つペプチドの群から作ることができる。上述のように、本発明者は、P1が植

物病原性バクテリアに対するその活性の故のみでなく、蛋白分解的減成に対するその天然の抵抗性の故に、AMP PPとして有用であることを見出した。P1はまた、モノマーとして植物毒性が天然に低い。しかしP1は、その抗菌性インバクトの点で幾分限定されている。従って、少くとも一つの植物病原体に対して活性でありかつ蛋白分解的減成に対し比較的抵抗性であるように好ましくは修飾された、修飾されたマガイニンとの二量体形でのその組合せは、生物及び特に植物及び植物組織の防禦のための有能なオリゴペプチドを提供する。得られるオリゴペプチドはまた、許容できる植物毒性を示す。本発明の他の特に好ましい頭尾二量体は下記を包含する。(SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2); (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1); (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 2)\*\*\*; (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1)\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 6) - (SEQ ID No. 1)\*\*\*; (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 7)\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 9); (SEQ ID No. 6) - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; (SEQ ID No. 10) - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 7) - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; (SEQ ID No. 3)\*\*\*\* - (SEQ ID No. 1); 及びMet - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\* - (SEQ ID No. 6)。ここで\*\*\*は、特定されるペプチドモノマーが順序を反転されうることを示し、\*\*\*\*は、特定されるペプチドモノマーが順序を反転されることができ、かつXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeuであり、Xaa<sup>7</sup>はHis、Lys、Phe、Ser及びArgより成る群から選ばれ、Xaa<sup>8</sup>はSer、His、Thr、Ala及びGluからなる群から選ばれ、Xaa<sup>10</sup>はGly及びLysからなる群から選ばれ、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPheであり、Xaa<sup>13</sup>はGly及びAlaより成る群から選ばれ、Xaa<sup>14</sup>はGly及びAlaより成る群から選ばれ、Xaa<sup>15</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMetであり、Xaa<sup>22</sup>はAsn及びLysより成る群から選ばれ、Xaa<sup>23</sup>はSer及びProより成る群から選ばれる構造を持つことを示す。[Des (Gly 1, Ile 2)] Mag 2, [Des (Gly 1, Ile 2)], Arg 7, Glu 8, Pro 23] Mag 1, [Des (Lys 22, Ser 23)] Mag 1及びこれらの誘導体を包含する、上記モノマーの単一及び複数残基欠如誘導体もまた

考えられる。本発明の頭尾三量体及び他の延長された頭尾多量は、少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含まねばならず、その夫々は少くとも一つの病原体及び好ましくは少くとも一つの植物病原体に対し活性である。好ましくは1〜約14の員である残りのペプチドサブユニットもまた、抗菌性ペプチド及び／又はAMPPPでありうる。最も好ましい頭尾オリゴペプチドは、抗菌性ペプチドモノマーのみを含む。しかし、残りのペプチドサブユニットが抗菌性を持つ必要はない。特に好ましい頭尾オリゴペプチド多量体の例は下記のものである。(SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1); (SEQ ID No. 1)<sub>4</sub>; (SEQ ID No. 2)<sub>4</sub>; (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2); (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1)\*\*\*; (SEQ ID No. 1) - [(SEQ ID No. 2)]<sub>4</sub> - (SEQ ID No. 3)\*\*\*\*; and (SEQ ID No. 7) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 9)\*\*\*; ここで“\*\*\*”及び“\*\*\*\*”は上記と同じ意味を持つ。直上で述べたオリゴペプチドと構造的に類似のオリゴペプチドの別のタイプは、いわゆるブリッジされたオリゴペプチドである。これらブリッジされたオリゴペプチドは、オリゴペプチドを構成するペプチドモノマーサブユニットの少くとも二つが介在するブリッジにより隔てられていることを除き、直上で述べた頭尾オリゴペプチドと同じでありうる。すなわち、その最も単純な形において、本発明のブリッジされたオリゴペプチドは、少くとも一つの第一の及び少くとも一つの第二のペプチドモノマー、及びブリッジより成る。該少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端は、ブリッジのN末端に直接にペプチド結合され、ブリッジのC末端は上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接にペプチド結合されている。得られる構造は、(SEQ ID No. 2) - ブリッジ - (SEQ ID No. 2) の構造を持つ二量体のブリッジされたオリゴペプチドと表わされることができ、これは二つのマガイニン2サブユニットのブリッジされた二量体であり、ここで“-”は本発明に従うブリッジ化ペプチドである。本発明のこの面に従う構造的に最も簡単なブリッジされた多量体は、一つのブリッジを持つ三量体である。たとえば、もし構造(SEQ ID No. 1)を持つペプチドモノマーがそのC末端を介して、上述のブリッジされた二量体において第2のマガイニン2のC末端に直接付着されると、得られるオリゴペプチドは構造(SEQ ID No. 2) - ブリッジ - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1)を持つであろう。しかし、ブリッジされた三量体が単一のブリッジ

化分子に限定される必要はない。たとえば、直上で述べた構造は、追加的ブリッジの使用によって変更されることができ、得られる三量体のブリッジされたオリゴペプチドは(SEQ ID No. 2) - ブリッジ<sub>1</sub> - (SEQ ID No. 2) - ブリッジ<sub>2</sub> - (SEQ ID No. 1)を持つであろう。ブリッジ<sub>1</sub>とブリッジ<sub>2</sub>は、同じでも異ってもよい。本明細書においてブリッジという言葉は、オリゴペプチド内の二つのペプチドサブユニットを隔てるために用いられる、アミノ酸に基づく分子を包含する。本発明におけるブリッジは、N及びC末端を持ち、従って慣用のペプチド結合によってペプチドサブユニットの各々に結合されるところの分子である。本発明におけるブリッジは、種々の長さ及び組成であることができる。しかし、その長さ及び組成に係わらずに、本発明のブリッジは、特定のオリゴペプチド中のモノマー間の分子内相互作用を促進できるものでなければならない。また、ブリッジは、ブリッジされたオリゴペプチド内の望ましくない細胞事象たとえばホスホリル化又はグリコシル化(このようなプロセスが不利であるなら)に対する抵抗を与える又は最小化することができるように、選択されねばならない。本発明の特に好ましい面において、ブリッジは、ブリッジされたオリゴペプチドが細胞膜及び特に真核植物細胞の細胞膜を通して動ける能力を妨害してはならない。即ち、本発明の好ましいブリッジされたオリゴペプチドは、細胞外空間に輸送される。本発明のオリゴペプチドは、いくつかの利点を持つ。そのより重要なものの一つは、病原体に対する保護を与えるこれら蛋白の能力である。上述のように、本発明者は、この抗菌活性のメカニズムを完全に判っている訳ではない。しかし、特定の作用理論に限定されるものではないが、本発明者は、この活性は、病原体の細胞膜において集合体及び膜破壊的チャンネルを形成するペプチドの能力に関係すると考えている。これら現象を促進するオリゴペプチドの能力は、個々のオリゴペプチド及び実際に多くの場合に相互作用する複数のオリゴペプチドのサブユニットの能力に少くとも部分的に依存するようである。これに従う頭尾オリゴペプチドは分子間相互作用及び／又はオリゴペプチド間相互作用により有益な集合体を促進する能力を示しうるが、一方、本発明のブリッジの使用により得られる結局は、少くとも植物病原性微生物に対するオリゴペプチドのより大きな活性(関連するAMPPPモノマーサブユニットに比べ)さえ示す。この現象の説明の一部は、種々のオリゴペプチド成分の分子内ダイナミクスにあるかも知れない。たとえば、頭尾二量体(SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2)は、高められた活性を持つことが判った。これは、二つのペプチドモノマーを結びつけているペプチド結合を取囲む領域の「フレキシビリティ」によるかも知れない。この領域が有利な二次及び三次コンホメーションを許す故に、結合されたペプチドモノマー

は相互作用を許される。この相互作用は、モノマーの一部が遷移的期間でさえ、相対的に極近接して置かれる能力に部分的に依存する。極近接という言葉は、少なくとも第一の及び少なくとも第二のペプチドモノマーの夫々のある部分が互に約10オングストローム未満、より好ましくは互に約7オングストローム未満内にもたらされることを意味する。本発明者は、ブリッジの使用が活性の更なる向上を与えることを見出した。即ち、ブリッジの使用は、おそらく、オリゴペプチドのサブユニット内の分子間相互作用を促進する。本発明に従うブリッジは、種々の方法でこれを達成しうる。ブリッジ（小さいものさえ）の使用は、個々のモノマー内に十分な空間を与えて、不利な立体障害を除く、又は有利な分子間相互作用を高めるであろうエネルギー的に安定な結合の形成を与える。更に、或るブリッジの使用は、有利なコンホメーションの形成を許すに十分な程度のフレキシビリティをオリゴペプチドに与える。即ち、フレキシビリティを与えることにより、ペプチドモノマー間に有利な間隔を与え、そしてモノマー間相互作用を許すことができる。他の可能性は、「フレキシブル」ではないけれども、有利なモノマー間相互作用を促進する位置にペプチドモノマーを置く特定のコンホメーションを与えるブリッジの使用である。本発明者は、5つ以下のアミノ酸の比較的小さなブリッジが、本発明に従うオリゴペプチドの構築に特に有用であることを見出した。これらブリッジは、モノマー間相互作用を更に促進する運動範囲を許し、又はそのような相互作用を直接促進する又は与える二次構造を提供するのに十分なフレキシビリティを、得られた構造に与える。本発明者はまた、得られたオリゴペプチドの構造を抑制しそしてモノマー間の可能性ある相互作用を阻げるかも知れない望ましくないペプチド二次構造、たとえばアルファヘリックス又はベータストランドは一般に5より多いアミノ酸長さを必要とすることを見出した。W. カブシュ (Kabsch) と C. サンダー (Sander), 「Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical figures」Biopolymers 22, (1983), 2577-2637 および R. ムスサミイ (Muthusamy) と P. K. ポヌスワミイ (Ponnuswamy), 「Variation of amino acid properties in protein secondary structures, alpha-helices and beta-strands」, Int. J. Peptide Protein Res. 38, (1990), 378-395 を、天然蛋白におけるアルファヘリックス及びベータストランドの分析に関し参照されたい。本発明の好ましいブリッジの一つは、(SEQ

ID No. 5 (ここで Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> は独立に、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Pro, Ser, Thr, Tyr 及び Val より成る群から選択される) の構造を持つ。特に好ましいブリッジは、Xaa<sup>1</sup> が Gly, Xaa<sup>2</sup> が Gly, Xaa<sup>3</sup> が Ser, Xaa<sup>4</sup> が Ser, Xaa<sup>5</sup> が Gly のもの、又は Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> が総てアミノ酸 Gly であるものである。5つのアミノ酸を含む他の好ましいブリッジは、(SEQ ID No. 5) (ここで Xaa<sup>1</sup> が Gly, Xaa<sup>2</sup> が Arg, Xaa<sup>3</sup> が Arg, Xaa<sup>4</sup> が Pro, Xaa<sup>5</sup> が Gly である) の構造を持つ。Gly に富むブリッジである後者は、溶液中でフレキシブルであると予想される。なぜなら、Gly 側鎖部分は、オリゴペプチドの何らかの有りうるたたみ込みを立体的に阻げて、オリゴペプチドのペプチドサブユニットの間のモノマー間相互作用を許しかつ事実促進することはなさそうであるからである。その結果は、標的病原性微生物に対するオリゴペプチドの活性の増大である。また、Gly 側鎖分子は、有益なモノマー間相互作用を妨害しうる水素結合又は静電荷ブリッジのようなエネルギー的に安定な構造又は相互作用に参加できない。同様に、種々の二次構造予測アルゴリズム [W. カブシュ及び C. サンダー (Biopolymers 22 (1983) 2577-2637; J. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120 (1978) 97-120; 及び P. Y. Chou & G. D. Fasman, Biochemistry, 13 (1974) 211-222 参照) により予測されるように水性溶液中でフレキシブルであることができ、かつ Gly に富むペプチドブリッジは、従って本発明によって許容できるであろう。ブリッジされたペプチド配列の好ましい例は (これらに限定されないが)、1~5 のアミノ酸を含む下記のものである。Ser-Ser-Gly-Gly, Ser-Ser-Gly-Gly-Gly, Ser-Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Ser-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, Gly, Gly-Gly など。好ましいブリッジペプチド又はより好ましいブリッジペプチドのサイズ要求を満たしうるブリッジペプチドの多数の他の組成がある。好ましい組成は、ベータターンを含むものであるが、これに限定されない (B. L. Sibanda 及び J. M. Thornton, Nature, 316, (1985), 170-174; 及び J. S. Richardson 及び D. C. Richardson, 前出、を参照)。同様に、単一アミノ酸ブリッジたとえば二つの抗菌性ペプチドモノマーの間のブリッジとしての単一の Gly の使用は、本明細書に記載したタイプのモノマー間相互作用を促進するのに十分なフレキシビリティ及び/又は十分な二次構造を与える。ブリッジは、本発明に従い有効であるために5以下のアミノ酸に

限られる必要はない。しかし、より大きいブリッジは得られるオリゴペプチドに望ましくない二次及び／又は三次コンホメーションを与えるかも知れないので、本発明のオリゴペプチドの種々のペプチドサブユニット間のモノマー間相互作用を与える又は促進するであろうブリッジのみを選択することが重要である。本発明で有用なより長いブリッジの群は、ヘリックス結合ペプチドユニットたとえばトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメイン、ループ又は他のフレキシブル結合ペプチド鎖を含む。本発明で有用なトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメインは、約6〜約100のアミノ酸の種々の長さである。細胞又は細胞膜内にあるドメインではなくて、これらドメインは、それらが細胞膜を通して輸送されることができ、従って、モノマー間相互作用を促進するだけでなく、細胞外空間への排せつをも促進するので、有用である。また、これら細胞外ドメインは、ある場合に、本明細書で述べるシグナル又は標的蛋白として働かう。K. ベルナー (Verner) 及び G. シャッツ (Schatz), 「Protein Translocation Across Membranes」Science 241, (1988), 1307-1313; L. Gierasch, 「Signal Sequences」Biochemistry 28, (1989), 924-930; 及び van Heijine, 前出、参照。天然に知られている多くのそのような細胞外ドメイン、たとえば (SEQ ID No. 16) 又は (SEQ ID No. 17) の構造を持つペプチドがある。本発明に従いオリゴペプチドを形成するにおいてブリッジとして有用でありうる別の公知の細胞外ドメインは、下記に同定されている。P. R. Schofield, "Sequence and Functional Expression of the GABA<sub>A</sub> Receptor Shows a Ligand-Gated Receptor super-Family," Nature 328, (1987), 221-227; J. E. O'Tousa, "The Drosophila ninaE Gene Encodes an Opsin," Cell 40, (1985), 839-850; A. Vassarotti, "Independent Mutation at the Amino Terminus of a Protein Act as Surrogate Signals for Mitochondrial Import," EMBOJ. 6, (1987), 705-711; J. P. Adelman, "Isolation of The Gene and Hypothalamic cDNA for the Common Precursor of Gonadotropin-Releasing Hormone And Prolactin Releas

es-Inhibiting Factor in Human and Rat," Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 83, (1986), 179-183; C. S. Zuker, "Isolation and Structure of a Rhodopsin Gene from D. melanogaster," Cell 40, (1985), 851-858; H. Vogel, "The Structure of the Lactose Permease Derived from Roman Spectroscopy and Prediction Methods," EMBOJ. 4, (1985), 3625-31; T. J. Jentsch, "Primary Structure of Torpedo marmorata Chloride Channel Isolated by Expression Cloning in Xenopus Oocytes," Nature 348, (1990), 510-513; A. Kamb, "Molecular Characterization of Shaker, a Drosophila Gene that Encodes a Potassium Channel," Cell 50, (1987), 405-413; A. Baumann, "Molecular Organization of the Material Effect Region of the Shaker Complex of Drosophila: Characterization of an l<sub>A</sub> Channel Transcript with Homology to Vertebrate Na<sup>+</sup> Channel," EMBO J. 6, (1987), 3419-29; T. Tanabe, "Primary Structure of the Receptor for Calcium Channel Blockers from Skeletal Muscle," Nature 328, 1987, 313-318; U. B. Kaup, "Primary Structure and Functional Expression from Complementary DNA of the Rod Photoreceptor Cycle GMP-gated Channel," Nature 342, (1989), 762-766; M. Noda, Nature 322, (1986), 826-828. オメガループは、規則立った構造を持たず、その端から端までの距離が約10オングストローム未満である。一般に約6〜約16のアミノ酸の長さの構造である。いくつかのオメガループは、もっと長い。これらループのいくつかは、細胞外ドメインとしても分類できる。天然に知られている多数のそのようなループ、たとえばファー

ジT4リゾチームのj.p. 48部分(残基134~139)(SEQ ID No. 18)又は*Bacillus stearothermophilus thermolysin*の一部(残基188~203)(SEQ ID No. 19)がある。本発明に従いオリゴペプチドを形成するにおいてブリッジとして有用でありうる他の公知オメガグループは、J. F. レジンスキー及びD. G. ローズ(J. F. Leazczynski及びG. D. Rose), "Loops in Globular Proteins: A Novel Category of Secondary Structure," *Science* 234, (1986), 849-855に同定されている。本発明のオリゴペプチドで用いられるとき、これらオメガグループは、モノマーを十分に近接させることによってモノマー間相互作用を促進しうる。本発明に従いブリッジとして用いうる他のフレキシブルな接続ペプチド鎖は、たとえば(SEQ ID No. 23)の構造を持つペプチドである。J. S. ヒューストン(Huston)ら, "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-digoxin single-chain Fv analog produced in *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)* 85, (1988), 5879-843参照。本発明の好ましい実施態様において、そのようなより長い鎖のブリッジは、一つのオリゴペプチド内の少なくとも二つのペプチドモノマーの間隔を与え又は促進して、約10オングストローム、より好ましくは約7オングストローム内に互を置くことができる。J. S. リチャードソン(Richardson), "The anatomy and taxonomy of protein structure," *Adv. Protein Chem.* 34, (1981), 167-339及びJ. S. リチャードソンとD. C. リチャードソン, "Principles and Patterns of protein conformation," in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (G. D. ファスマン編集; Plenum Press, New York, NY), pp. 1-98 (1989)を、上記いくつかの段落に述べたペプチド又は蛋白の二次構造要素の定義及び検討のために参照されたい。従って、本発明のブリッジは、1つのアミノ酸のように小さくてもよく、また100のアミノ酸のように大きくてもよい、しかし、より好ましくは、ブリッジは約1~約20のアミノ酸を含む。ブリッジの長さは、多数の因子に基いて変わりうる。本発明の好ま

しい実施態様において、ブリッジは、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValから成る群から選ばれることができる一つのアミノ酸である。本発明のこの面でのより好ましい実施態様において、ブリッジはAla, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, and Valより成る群から選ばれた一つのアミノ酸から成る。本発明で特に好ましくはブリッジは、Gly, Ala又はSerである。2~4のアミノ酸を持つブリッジも、オリゴペプチドの作成のために有利に用いうる。これらブリッジで用いられるアミノ酸は、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValから成る群から選ばれることができる。より好ましくは、アミノ酸は、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Tyr及びValから成る群から選ばれる。本発明の好ましいブリッジは、(SEQ ID No. 4) (ここでXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>4</sup>は直上で述べたように置換されてもよい)の構造を持つものを包含する。得られるブリッジは、Xaa<sup>1</sup>がGly, Ser, Asn又はLys, Xaa<sup>2</sup>がGly, Lys, Asp, Ala又はArg, Xaa<sup>3</sup>がGly, Glu, Thr又はSer, Xaa<sup>4</sup>がGly, Glu, Pro又はSerであるものを包含する。一以上のCysアミノ酸を含むブリッジも含まれうる。2~4のアミノ酸長さのブリッジは、たとえばベータターンを形成するペプチドたとえば、Gly-Gly, Ser-Lys, Ser-Gly, Asn-Lys-Glu-Glu、及びSer-Asp-Gly-Pro、ならびに他のペプチド、たとえばSer-Ser, Gly-Arg-Ser, Ala-Lys-Ala, Lys-Ala-Thr-Glu、及びGly-Arg-Ser-Serを包含する。2~5のアミノ酸長さを含む他のブリッジはAla, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr、及びValより成る群から選ばれたアミノ酸より構成されるものである。より好ましくは、アミノ酸は、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Tyr、及びValより成る群から選ばれる。本発明の好ましい他のブリッジは、(SEQ ID No. 5) (ここでXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>5</sup>は上記の群から選ばれることができる)の構造を持つものである。好ましい実施態様において、この5員ブリッジは、Gly, Al

10

20

30

40

50

例えば、一つのジスルフィドブリッジを持つオリゴペプチドは、上述したような頭尾配置で直接結合された他のペプチドサブユニット、及び／又は上述のようにブリッジで結合されてもよい追加的ペプチドサブユニットを含む。これらオリゴペプチドの例としては、下記が挙げられるが、これに限定されない。HO-(SEQ ID NO. 20)\*-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH; H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)\*-NH<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 9)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 1)-OH; H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH; H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)-(SEQ ID NO. 5)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH; H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)<sub>4</sub>-(SEQ ID NO. 1)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 2)-OH; H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 20)<sub>4</sub>-(SEQ ID NO. 9)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 10)-OH; H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 15)-(SEQ ID NO. 3)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 9)-(SEQ ID NO. 5)-(SEQ ID NO. 20)-OH.

上述のように、「-」はペプチド結合を示し、「-S-S-」はジスルフィド結合を示し、「\*」は反転された位置でのペプチドを示す。隣接ペプチドサブユニット間にジスルフィド結合を与える方法としての末端Cysの使用はまた、同じ末端Cysがペプチド結合により他のペプチドに更に結合する可能性を許す。ここで「他のペプチド」とは、単一のアミノ酸残基のような小さな構造、及び少くとも一つの病原体に対し活性なペプチドを含む。それは、全く不活性なペプチドでもよい。従って、特定のCysがペプチド結合により二つのペプチドに機能的に結合され（その一つがペプチドモノマーである）、また少くとも一つの他のペプチドモノマー上に含まれるCysにジスルフィド結合により結合されている枝分れたオリゴペプチドを作ることができる。そのようなペプチドの例は、少くとも一つの第一のペプチドモノマーが構造(SEQ ID No. 1)を持つペプチドの単一残基C末端付加誘導体であり、かつ少くとも一つの第二のペプチドモノマーが構造(SEQ ID No. 2)のペプチドの単一残基N末端付加誘導体であり、かつたとえ構造(SEQ ID No. 6)のもう一つのペプチドが備えられるところのオリゴペプチドを包含する。得られるペプチドは、下記のように示される。

【化1/】ここで「-」はペプチド結合を示し、「-S

-S-」はジスルフィド結合を示す。このタイプのオリゴペプチドの他の例は、下記の構造を持つ。

【化2/】ここで、アスタリスクは、反転されたペプチド（この例ではCysの単一残基C末端付加を持つ(SEQ ID No. 2)の反転形)を示し、「-」はペプチド結合を示し、「-S-S-」はジスルフィド結合を示す。第一の例は、ジスルフィド結合されたペプチドモノマーについて頭尾配置を含み、第二の例は、尾尾配置を示す。本発明に従う別のオリゴペプチドは、内部的にCysで置換された少くとも一つのペプチドモノマーを含む。即ち、これらオリゴペプチドは、N又はC末端以外でCysにより置換された少くとも一つのモノマーを用いる。従って、各ペプチドモノマーの内部部分内でペプチドを「架橋」することができる。たとえば、夫々が位置22でCysにより置換された（即ち、位置Xaa<sup>22</sup>で通常のAsnをCysで置換）ところの構造(SEQ ID No. 2)を夫々持つ二つのペプチドモノマーがジスルフィド結合されうる。あるいは、一つの内部的にCys置換されたペプチドモノマーは、上述したN又はC末端Cysモノマーにジスルフィド結合により連結されうる。そのようなオリゴペプチドの例は、構造(SEQ ID No. 2)-Cys（すなわち、マガイニン2の単一残基C末端付加誘導体）を持つ第一のペプチドモノマー及び構造(SEQ ID No. 2)（ここでたとえば、位置Xaa<sup>22</sup>のAsnはCysで置換されている）を持つ第二のモノマーのジスルフィド結合を介する連結を含む。すると、これらモノマーは、二つのCysアミノ酸の間に形成されたジスルフィド結合により接続される。本明細書で定義したブリッジ及びジスルフィド結合の両者を含むブリッジ化構造を持つオリゴペプチドを作ること、本発明に従い有利である。即ち、たとえば、構造(SEQ ID No. 3)-S-S-Cys-(SEQ ID No. 4)-(SEQ ID No. 2)〔ここで(SEQ ID No. 3)中のXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はCys、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>16</sup>はGly、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はSerであり、そして(SEQ ID No. 4)のXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>4</sup>は夫々Glyである〕を持つオリゴペプチドを作ることができる。ジスルフィド結合は、第一のペプチドモノマーの位置8のCysと、第二のモノマーに付着された、5つのGlyを含むブリッジに付着されたN末端Cysの間に形成される。複数のブリッジユニットを含めることも有用であり、たとえば得られる構造は次の通りである。(SEQ ID No. 2)-(SEQ ID No. 5)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID No. 5)-(SEQ ID No. 3)又は(SEQ ID No. 2)-A









56

40

Gly、Xaa<sup>1'0</sup>はGlu、Xaa<sup>2'1</sup>はMet、Xaa<sup>2'2</sup>はLys、そしてXaa<sup>2'3</sup>はPro；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 10) ここで (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は Phe、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>1'0</sup> は Lys、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、Xaa<sup>2'2</sup> は Asn、そして Xaa<sup>2'3</sup> は Ser；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラス (SEQ ID NO. 1)；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラス (SEQ ID NO. 2)；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラス Met- (SEQ ID NO. 3)；ここで (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は Arg、Xaa<sup>8</sup> は Glu、Xaa<sup>1'0</sup> は Gly、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、Xaa<sup>2'2</sup> は Lys、そして Xaa<sup>2'3</sup> は Pro；(SEQ ID NO. 2)-(SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで初めの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>1</sup> 及び Xaa<sup>2</sup> は除去され、Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>1'0</sup> は Gly、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、Xaa<sup>2'2</sup> は Lys、そして Xaa<sup>2'3</sup> は Serであり、二つめの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>1'0</sup> は Gly、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、そして Xaa<sup>2'2</sup> 及び Xaa<sup>2'3</sup> は除去されている；(SEQ ID NO. 10) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで初めの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>1</sup> 及び Xaa<sup>2</sup> は除去され、Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>1'0</sup> は Gly、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、そして Xaa<sup>2'2</sup> 及び Xaa<sup>2'3</sup> は Serであり、二つめの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>1'0</sup> は Gly、Xaa<sup>1'1</sup> は Lys、Xaa<sup>1'2</sup> は Phe、Xaa<sup>1'3</sup> は Gly、Xaa<sup>1'6</sup> は Gly、Xaa<sup>1'9</sup> は Glu、Xaa<sup>2'1</sup> は Met、そして Xaa<sup>2'2</sup> 及び Xaa<sup>2'3</sup> は除去されている。

MetそしてXaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>は除去されている; Met-(SEQ ID NO. 3)プラス(SEQ ID NO. 3)プラス(SEQ ID NO. 3)ここで初めの(SEQ ID NO. 3)についてXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はAla、Xaa<sup>14</sup>はAla、Xaa<sup>15</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLys、そしてXaa<sup>23</sup>はSerであり、二つめの(SEQ ID NO. 3)についてXaa<sup>1</sup>及びXaa<sup>2</sup>は除去され、Xaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>14</sup>はGly、Xaa<sup>15</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLys、そしてXaa<sup>23</sup>はSerであり、三つめの(SEQ ID NO. 3)についてXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>14</sup>はGly、Xaa<sup>15</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、そしてXaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>は除去されている; 等々。上記のペプチドに加えて、本発明の相補的混合物は更に、担体、希釈剤、保存剤、緩衝剤などを含むことができる。これは、緩衝剤たとえばトリス(トリス-[ヒドロキシメチル]アミノメタン); MES(2-[N-モルホリル]エタンスルホン酸); 及びHEPES(N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N-[2-エタンスルホン酸)、及び保存剤たとえばアシドナトリウム又はチメロサルを含む。これら添加物の混合物もまた、有用でありうる。用いられる場合、これら添加物は一般に、約0.01~約10%(w/v)の量で存在する。本発明の相補的混合物で用いられるペプチドは、本明細書記載の化学的又は遺伝子方法で作ることができる。そして、これらのペプチドは集められ、適当な比で混合され、従って、本発明のRAMPPP及びオリゴペプチドが提供するのとはほぼ同じ方法で、植物又は他の生物に保護を与える。また、これら混合物は、たとえば上記したP1及び[Arg7]Mag1の共存を許すことによって遺伝子的に作ることができる。得られる表現されたペプチドは、従って、本発明の相補的混合物をインサイツに形成する。そのようなインサイツ形成は、細胞の内部小室内で実現でき、又は、ペプチドが細胞間の細胞外空間に個々に排せつされた後に実現できた。また、該混合物は、たとえばP1のペプチドモノマーのC末端が、N末端にHisそしてC末端にSerを持つ二つのアミノ酸から成るペプチドブリッジのN末端に結合され、ブリッジのC末端がたとえば上述のマグニン1の単一残基置換誘導体のN末端Glyに結合されているところのブリッジされた二量体オリゴペプチドの

作成により、作ることができた。本発明者は、活性であり、His-Ser結合を認識し、この間の結合を切る植物プロテアーゼが存在することを確認した。すなわち、得られたオリゴペプチドが細胞から排せつされるとき、細胞外プロテアーゼが二つのペプチドを開裂して、P1の単一残基C末端付加誘導体(His)と上記置換されたペプチドの単一残基N末端付加誘導体(Ser)の相補的混合物をもたらすであろう。この例において、少くとも一つの第一のペプチドP1は、そのN末端に付着されたMet又は(f)Metを更に持つことができる。従って、得られるペプチドは、P1の単一残基N末端及び単一残基C末端付加誘導体である。

#### ペプチド、ペプチドモノマー(反転ペプチドを含め)、及びオリゴペプチドの化学的合成法

本発明に従う抗菌性ペプチド(AMPPPを含め)、反転ペプチドならびにオリゴペプチド、ブリッジ及びペプチドモノマーは、伝統的な化学的合成により、又は一以上のペプチド、ブリッジ及び/又はフラグメントを遺伝子的にエンコードする特定のDNA物質を宿主細胞に挿入し、この細胞に望むペプチドを表現させる一以上の方法により、有利に作ることができる。伝統的な化学的合成については、本発明に従う抗菌性ペプチド、反転ペプチド、ブリッジ及びオリゴペプチドは、いずれかの公知のペプチド合成手順、たとえば「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」Volume 2-「Special Methods in Peptide Synthesis, Part A」, E. GrossおよびJ. Meienhofer編 Academic Press, New York, 1980、及びVolume 9-「Special Methods in Peptide Synthesis, Part C」S. Udenfriend及びJ. Meienhofer編, Academic Press, San Diego, 1987に記載された方法を用いて合成できる。ペプチドの化学合成のために本発明で好ましく用いられるのは、固相法である。なぜなら、これは、高度に純粋なペプチドの迅速な合成を可能にするからである。そのような手順において、ペプチドのC末端から出発して、不溶性ポリマー支持体(樹脂と呼ばれる)上で、好ましくは一度に一つのアミノ酸で、ペプチドが合成される。ペプチドのC末端アミノ酸(CTAA)を樹脂に、化学的結合基たとえばアミド又はエステルを介して付着することにより合成は始められる。もしエステルとして樹脂に結合されるのなら、得られるペプチドはC末端カルボン酸であり、アミドとして結合されるのなら、得られるペプチドはC末端アミドである。ペプチド合成に用いられるCTAAならびに他の総てのアミノ酸は、そのアルファアミノ基及び側鎖官能基(もしあれば)を、合成の間に選択的に除去(脱保護)されうる誘導体として差別的に保護されね

ばならない。合成(カップリング)は、アミノ酸の活性化された(たとえば、その対称的無水物又は活性エステル)を、樹脂に付着されたN末端アミノ酸のブロックされていないアルファアミノ基と反応させることにより実施される。そのようなアルファアミノ基の脱保護及び続くカップリングの手順を、望むペプチド鎖が構築されるまで繰返す。次に、ペプチド中に存在する官能基の総てを脱保護し、通常スカベンジャーと呼ばれる化合物(このプロセスの間にペプチドとの副反応を禁止する)の存在下で、樹脂から開裂する。次に、得たペプチドを、種々の方法たとえばゲル濾過、イオン交換及び高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により精製する。開裂及び精製のプロセスの間に、N末端に存在するアミノ基に又はペプチドのリシン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)又はオルニチン(Orn)に結合された多数の酸塩形のいずれに転化されるかも知れず、従って、得られる純粋なペプチドは通常、そのような塩の形で得られる。下記に記載されているメリフィールド型の固相法が本発明で好ましく用いられる。G. バラニイ(Barany)とR. B. メリフィールド(Merrifield)、「Solid-Phase Peptide Synthesis」The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Volume 2, Ch. 1, pp 3-284; 及びJ. M. StewartとJ. D. Young, 「Solid-Phase Peptide Synthesis, 第2版」Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1984。一般に、任意の標準的側鎖基保護手法を有利に用いるが、t-Boc(tert-ブチルオキシカルボニル; たとえば、バラニイとメリフィールド、及びスチュワートとヤング、前出)及びFMOC(9-フルオレニルメトキシカルボニル、たとえばE. アーサートンとR. C. シェパード、「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」, 前出、第9巻、第1章、第1-38頁)の手法が好ましい。C末端カルボン酸を含むペプチドの先駆体として必要なペプチド樹脂の合成は、典型的には、市販入手できる架橋ポリスチレン又はポリアミドポリマー樹脂、たとえばクロロメチル、ヒドロキシメチル、アミノメチル、PAM(フェニルアセトアミドメチル)、HMP(p-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸)、p-ベンゾイルオキシベンジルアルコール、Hycram(4-プロモクロトニル-β-アラニルアミドメチル); Advanced Chemtech社、ルイズビル、KY)、又はSasrin(2-メトキシ-4-アルコキシベンジル)アルコール; Bachem Bioscience社、フィラデルフィア、PA)上で始められる。アミノ酸のカップリングは、たとえばDCC(ジシクロヘキシルカルボ

ジイミド)、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)から作られる対称無水物、又はたとえばDCC/HOBtから又はたとえば種々のBOP剤[たとえばJ. コステ(Coste)ら「BOP and Congeners: Present Status and New Developments」, Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium: Peptides: Chemistry, Structure and Biology, J. E. RivierとG. R. Marshall, 編, ESCOM, Leiden, Neith., 1990, pp 885-888を参照]から作られた活性エステルを、溶剤たとえばDCM(ジクロロメタン)、DCM含有TFE(トリフルオロエタノール)、DMF(N,N-ジメチルホルムアミド)、NMP(N-メチルピロリドン)又はNMP含有DMSO(ジメチルスルホキシド)中で用いることによって達成できる。本発明で好ましく用いられるのは、DMF又はDMF/DCM溶液中でPAM樹脂上での、t-Boc保護されたアミノ酸[但し、アルギニン(Arg)、アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln)及びヒスチジン(His)を除く。これらは、好ましくはDCC/HOBtから作られたHOBt活性エステルとしてカップリングされる]、及びNMP溶液中でHMP-ポリスチレン樹脂上での、FMOC保護されたアミノ酸のDCC/HOBt製造のHOBt活性エステルのカップリングである。本発明でより好ましいのは、初めに1.9ミリモルのDIEA/0.5ミリモルのPAM樹脂を含むNMP中で、次にNMP/DMSOの80/20溶液中で、最後にNMP/DMSOの80/20溶液中でPAM樹脂へのt-Boc保護されたアミノ酸のDCC/HOBt製造のHOBt活性エステルのカップリングである。C末端アミドを含むペプチドへの先駆体としてのペプチド-樹脂の合成は、上述の手順を用いて満足に行える。しかし、ベンズヒドリルアミン(BHA)又は4-メチルベンズヒドリルアミン(MBH A)ポリスチレン樹脂のようなポリマー支持体を用いなければならない。本発明のこの面、すなわちC末端に結合されたアミド基を持つAMPPPの製造において、4-メチルベンズヒドリルアミン-ポリスチレン樹脂が好ましく用いられる。多くのタイプの側鎖保護基が、たとえば、バラニイとメリフィールド(前出)、グロスとメインホファー編「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」Volume 3-「Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis」, Academic Press, New York, 1981。およびスチュワートとヤング(前出)によりt-Bocアミノ酸について記載されたように、またアサートンとシェパード(前出)

によりFMOCアミノ酸について記載されたように、 $t$ -Boc又はFMOC固相合成のために用いられる。 $t$ -Bocアミノ酸のために本発明で好ましいのは、アルギニンのためのMTS（メシチレン-2-スルホニル）、アスパラギン酸のためのOBzl（ベンジルエステル）、システインのための4-Me Bzl（4-メチルベンジルチオエーテル）、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンのためのBzl<sub>2</sub>（ジベンジルジエーテル）、グルタミン酸のためのOBzl、ヒスチジンのためのBom（ベンジロキシメチル）又はZ（ベンジロキシカルボニル）、3-及び4-ヒドロキシプロリンのためのBzl、リシン及びオルニチンのためのCl-Z（2-クロロベンジロキシカルボニル）、セリン及びスレオニンのためのBzl、トリプトファンのためのCHO（ホルミル）、チロシンのためのBr-Z（2-ブロムベンジロキシカルボニル）である。メチオニンは、そのスルホキシドとして[Met(0)]保護されるが、好ましくは保護されずに用いられる。本発明に従うAMPPP、RAMPP、RAMPPP、オリゴペプチド及びブリッジを含むペプチドは、自動化装置で又は人の手による方法で合成できる。しかし、自動化法が好ましい。本発明で述べられるAMPPPの例の総ては、Applied Biosystems (ABI) 社のModel 430A自動化ペプチド合成機を用いて、そのユーザーマニュアル、バージョン1.30、セクション6、Applied Biosystems、フォスター市、CA、1987年2月（1987年11月及び1988年10月改訂）記載の $t$ -Bocプロトコルを用いて実際に作られた。これらプロトコルに従い、ペプチドは、ペプチドのC末端から出発して樹脂で組立てられる。C末端カルボン酸の合成のために必要なPAM又はHMP樹脂は、ABI又は他の製造者から購入でき、 $\alpha$ -アミノ酸及び側鎖保護されたC末端アミノ基に既に結合されている。しかし、C末端カルボキシアミドを作るとき、C末端アミノ酸は初めにBHA又はMBHA樹脂にカップリングされねばならない。いずれの場合でも、 $\alpha$ -アミノ酸及び側鎖保護されたC末端アミノ酸を含む樹脂は反応容器に入れられ、ペプチド鎖は、樹脂に付着されたN-末端アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の脱保護及びこれに次のアミノ酸（これも $\alpha$ -アミノ及び側鎖保護されている）へのカップリングの繰返しによって、一度に好ましく組立てられる（ペプチドのフラグメントの組立は可能であるが、本発明のAMPPPのためには通常あまり好ましくない）。N-末端アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の脱保護及び次の保護されたアミノ酸のカップリングの順は、望むペプチド鎖が組立てられるまで続けられる。ポリマー支持体に結合された、得られたN末端及び側鎖保護されたペプチドは次に、適当な脱保護及び開裂手順に付されて、通常、N末端及びリシン、ヒスチジン、アルギニン及びオルニチン酸塩として、保護

されていないペプチドを与える。合成は、カップリング段階において0.5ミリモルのC末端アミノ酸樹脂及び2.0ミリモルの側鎖保護された $t$ -Bocアミノ酸から出発して、 $t$ -Boc保護ストラテジーを用いて実施された。しかし、これらの量は重要でなく、用いる自動化装置又はマニュアルの道具のタイプに依存して、比例してより大きな又は小さな量を用いる。たとえば、0.1ミリモルのような少量及び0.6ミリモルのような大量のアミノ酸-PAM樹脂を用いる合成を、ABI装置を用いて本発明者は行った。この装置を用いるとき、カップリングされるべきアミノ酸対PAM樹脂に付着されたアミノ酸又はペプチドのモル比は4が好ましいけれど、より大きい又は小さい比も用いる。3.33のような小さな比（0.6ミリモルのPAM樹脂/2.0ミリモルのアミノ酸）が、カップリング効率の何ら重大な低下なしに用いられた。一回当たり作られるペプチドの量を増すために、より低い比を用いるが、カップリング効率、従ってペプチド純度が低るので、あまり好ましくない。より大きな比は、もはや効率的でないで、一般に好ましくない。DMF中での $t$ -Boc保護手法に基づく合成において、 $\alpha$ -アミノ基の脱保護は、TFA/DCMを用い、次にDIEA/DMFでの中和により、環境温度で行われる。対称的な無水物はDCM中でDCCから形成される。但し、ロイシン、メチオニンスルホキシド、トリプトファン及びホルミルトリプトファンはDCM中の10%DMF中で形成される。副生成物DCU（N,N-ジシクロヘキシルウレア）の濾過後、DCMは気化され、DMFで置き換えられ、この間温度は10~15°Cに維持される。この手順を用いて合成されるAMPPPのために、成長するペプチド鎖の長さが9のアミノ酸を越えた後、ダブルカップリングされる。これらの場合、濾過後のDCM溶液は、次の段階で直接用いられる。HOBT活性なエステルは、アスパラギン、グルタミン及び保護されたヒスチジンについては8-10% v/v DCMを含むHOBTとDCCとの反応から、及びアルギニン（MTS）について25-30% v/v DCMを含むHOBTとDCCとの反応から形成される。副生成物DCUの濾過後に、HOBT活性エステル溶液は、DCMの除去なしに次の段階で直接用いられる。これら4つのアミノ酸は常に、同じ手順を用いてダブルカップリングされる。適当な溶剤中でアミノ酸対称無水物又はHOBT活性エステルが形成されると、溶液は反応容器に移され、N末端 $\alpha$ -アミン脱保護されたペプチド樹脂と共に振り動かされる。この間にカップリングが起り、これは当初、対称無水物については18~26分間、活性エステルについては26~42分間である。ペプチド鎖が長くなると、カップリング時間は一般に増大される。たとえば15のアミノ酸後には10分間が追加される。カップリングは当初、対無水物が形成される温度で行われるが、カップリング期間の間に

序々に環境温度に達する。カップリング期間の完了時に、樹脂をDCMで洗い、ニンヒドリン検出のためにサンプルを取り〔サリン (Sarin) 5, "Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction," Anal. Biochem. 117, (1981), 147-157 参照〕、そして次のカップリングサイクルの準備のために乾燥させる。NMP中でのt-Boc保護手法に基づく合成において、 $\alpha$ -アミノ基の脱保護は上記のように行われるが、但し、過剰のTFAの中和は、DIEA/DCM、DIEA/NMP、及びNMP単独での洗浄により行われる。DCC、HOBT及びN-末端及び側鎖保護されたアミノ酸の各1.0当量をNMP中で環境温度で約40~60分間反応させることによって総てのアミノ酸はHOBT活性エステルへと転化される。副生DCUの濾過の後、HOBT活性エステル溶液は、カップリング反応で直接用いられる。カップリングは環境温度でDMP中で30分間、DMSOのNMP中の20:80溶液を与えるべく十分なDM

20 SOを加えてから更に16分間、そして最後に、1.9ミリモルのDIEAの添加後に更に7分間行われる。ペプチド鎖が長くなるにつれて、より長いカップリング時間が用いられる。たとえば、ペプチド鎖が15のアミノ酸に達した後は、カップリング時間は15分間延長される。ダブルカップルサイクルは、シングルカップルサイクルと同じように行われるが、Lys<sup>4</sup>又はAMPPPにおける均等物のためにのみ一般に用いられた。カップリングサイクルの完了時に、ペプチド樹脂上に残る未反応のアミノ基は、これを、DCM中の10%無水酢酸及び5%DIEAの溶液で5分間処理し、次にDCM中の10%無水酢酸と4分間振とうすることによってキャップされる。DCMでよく洗った後に、樹脂のサンプルを、上記のようにカップリング効率のニンヒドリン検出のために採り、そして次のカップリングサイクルの準備のために乾燥する。DMF又はNMPを用いてカップリング効率は常に98%より大きく、殆どの場合99%より大きかった。AMPPP、オリゴペプチド、フラグメント、逆ペプチドおよびフラグメントを含む本発明のペプチドはここに記載されかつABIモデル430Aペプチド合成装置として入手できるFmoc化学により上首尾で合成できる〔K. H. オットソン (Otterson) "NMP化学に関する最近の進展 (Recent Developments with NMP Chemistry) の" タンパク化学は芸術か科学か? (Is Protein Chemistry an Art or a Science)" アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems), FASEBミーティング, ニューオルレアンズ, 1989年4月〕。また、S. ノザキ (Nozaki) は、"連

続流動条件下でのマガイニン1の固相合成 (Solid Phase Synthesis of Magainin 1 Under Continuous Flow Conditions)" Chem. Lett., 1989, pp. 749-752において、HMP樹脂を使用し、ここに記載のものと極めて類似する自動化Fmoc法を用いてマガイニン1を合成する方法を詳細に記載している。ここに記載するペプチドすべては別々に調製されるが、多数のペプチドを同時に調製することもしばしば望ましく、かつ当を得たものである。このような合成を実施する手順は文献で周知であり、このような仕事を行うための市販の装置も入手できる。例えば、クエルボ (Cuervo) 等の上記文献の"マガイニン類: 高い抗生物活性および低い溶血活性に係る配列因子 (The Magainins: Sequence Factors Relevant to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity) および上記文献の"マガイニンのアラニン置換類似体の合成および抗生物活性 (Synthesis and Antimicrobial Activity of Nagainin Alanine Substitution Analogues)" においてC-末端アミドをもつ省略およびアラニン置換類似体並びにマガイニン1および2のカルボン酸の、PAMおよび4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂両者上のt-Boc保護アミノ酸を用いるSMPS (同時の多数のペプチドの合成 (Simultaneous multiple peptides Synthesis)) 法を利用した同時合成を報告している。また、F. S. ツヨング (Tjoeng) 等は"単一の支持体を用いた多数のペプチドの合成 (Multiple Peptide Synthesis Using a Single Support (MPS3))," Int. J. Peptide Protein Res., 1990, 35, pp. 141-146において、t-Boc保護アミノ酸およびPAM樹脂を用いた、21-位において種々のアミノ酸で置換されたマガイニン2の類似体の同時合成を報告している。しかし、同じ論文においてこれらの著者は、この方法がブタアンジオテンシンノーゲンペプチドの11-置換類似体の同時合成について、ABIモデル430Aペプチド合成装置を用いて自動化できることを示した。上記論文に記載されたものと同様な手順が特に本発明の実施のために利用できる。これに従えば、好ましい方法では、3種のマガイニン置換類似体の同時合成のために、t-Bocアミノ酸、PAM樹脂、およびDCC/HOBTカップリング (NMP-NMP/DMSO中) が利用できた。多数の置換類似体が同時にカップリングできるが、生成したペプチドの分離はより困難になり、かつ生成した各ペプチドの収量は減

少する。本発明の実施に際して、多くの共通なセグメントを含む種々のペプチド部分を同時に合成することが可能である。例えば、置換のためにC-末端のみが異なるペプチドまたは鎖長のみ異なるペプチドは、異なるC-末端配列を含むPAM樹脂を一緒に混合し、次いで同時に周期的に共通のアミノ酸セグメントを通常の方法で該樹脂混合物にカップリングすることにより同時に合成できる。このために、好ましい方法では、PAM樹脂上でt-Bocアミノ酸を用い、NMPまたはNMP/DMSO中でのDCC/HOBTを利用して生成したHOBT 10 活性エステルを使用する。同様に、主としてN-末端の異なるペプチドの多数のセグメントを、まず共通のC-末端鎖を含むペプチド-PAM樹脂を、該N-末端における初めて異なるアミノ酸に至るまで調製することにより、同時に合成できる。次いで、このペプチド樹脂を別々の容器に分割し、各ペプチド合成を別々に続ける。2種の生成したペプチド樹脂をカップリングして完成するか、あるいは更にペプチド合成の後の段階で、他の所定の分岐部分に達した時点で分割する。本発明の範囲内の多数ペプチド合成で使用するのに好ましいのは、NMP 20 またはNMP/DMSO中でのDCC/HOBTカップリングを利用したPAM樹脂上でのt-Bocプロトコルである。生成するペプチド樹脂の量を増すために、標準的な0.5mMよりもむしろ0.6mMの樹脂を、多数ペプチドの合成でカップリング効率を損うことなく利用できる。C-末端カルボン酸またはアミノ酸ペプチド用の先駆体として得たペプチドは、文献に記載されている周知の任意の標準的方法（例えば、バラニー（Barany）およびマリフィールド（Marrifield）の上記文献、スチュアート（Stewart）等の 30 上記文献、J. P. タム（Tam）& R. B. マリフィールド（Marrifield）の“合成ペプチドの強酸脱保護：機構と方法（Strong Acid Deprotection of Synthetic Peptides: Mechanisms and Methods）”（“ペプチド・分析、合成、バイオロジー（The Peptides Analysis, Synthesis, Biology）”, vol. 9, 第5章, pp. 185-248）およびアブライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）, “ペプチド合成における戦略-開裂法の基礎（Strategies in Peptide Synthesis-Introduction to Cleavage Techniques）”, 1990, アブライドバイオシステムズを参照のこと）を利用して、該樹脂から開裂および脱保護できる。例えば、t-Bocペプチド樹脂についていえば、これらは標準無水HF（弗化水素）、低/高HF、TFMSA（トリフルオロメタンスルホン酸）およびTMSOTf（トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート）を含む。しか 50

し、標準HFおよび低/高HF法は、t-Bocペプチド樹脂からの脱保護および開裂のために本発明で使用するのが好ましい。また、N-末端t-Boc保護基は、該ペプチドをHF脱保護および開裂する前に除去することが好ましい。標準的な無水HF条件を用いたt-Bocペプチド-PAMの開裂および脱保護は、一般に上に挙げた参考文献に与えられている方法に従って行われる。典型的には、約1gの該ペプチド樹脂を、 1. 0mlのアニソール、0.4mlのジメチルスルフィド（DMS）、0.2~0.4mlの1,2-エタンジチオールおよび3mgの2-メルカプトピリジンをスキャベンジャーとして含む10~12mlの無水HF溶液中で、-5℃~0℃にて約50~90分攪拌する。存在するスキャベンジャーの量のわずかな変動は結果に大きな影響を与えず、また上で引用した文献中に記載されたような他のスキャベンジャーを使用してもよい（例えば、トリプトファンを含むペプチドでは3mgのスカトールをも添加すべきである）。しかし、上に特定した反応時間および温度を用いることが好ましい。というの 10 は、短い反応時間および低い反応温度は不完全な脱保護および開裂をもたらす可能性があり、一方高い反応温度は副反応を生ずる恐れがある。長い反応時間は一般に望ましくなく、副反応を起こす恐れがあるが、いくつかの場合には、例えばトシル基で保護されたアルギニンまたは数個のアルギニンが該ペプチド鎖中に存在する場合、より完全な脱保護のためには2時間までの反応時間が必要とされる可能性がある。このHF法を実施するのに特に好ましい方法は、イムノダイナミック社（Immuno-Dynamics Inc.）（カリフォルニア州、ラジョラ）の方法である。この方法では、HF/スキャベンジャー/ペプチド樹脂混合物をまず-10℃にて 30 30分間攪拌し、次いで0℃にて30分（0℃にてアルギニン1個当たり5分以上）攪拌する。該“低/高（low/high）”無水HF法は、メチオニンのアルキル化などの副反応を最小化するために、本発明に記載の任意のペプチド樹脂の脱保護および開裂に使用できるが、複数のペプチドの同時合成で生成したペプチド樹脂混合物の脱保護および開裂のために特に好ましい。これに続く好ましい手順は基本的にはJ. P. タム（Tam）等の“ジメチルスルフィド中での低濃度HFによる合成ペプチドのSH<sub>2</sub>脱保護：ペプチド合成における検証および応用（SN<sub>2</sub> Deprotection of Synthetic Peptides with a Low Concentration of HF in Dimethyl Sulfide: Evidence and Application in Peptide Synthesis）”, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, pp. 6442-6455およびタムおよびマリフィールドの上記文献 50 における“合成ペプチドの強酸による脱保護：機構およ



び方法 (Strong Acid Deprotection of Synthetic Peptide s: Mechanisms and Method s) ”に記載のものであり、これらは2.5:6.5:1の無水HF/ジメチルスルフィド/p-クレゾール10~20ml (好ましくは10~12ml) 中に約1gのペプチド樹脂を含む溶液を-5℃~0℃にて約2時間攪拌 (該ペプチド樹脂がTrp (For) を含む場合には、次いで10:26:3:1の無水HF/ジメチルスルフィド/p-クレゾール/チオクレゾールの溶液を代りに使用する) する。次に、HFとDMSとを約-5℃~0℃にて真空下で除去し、新たに無水HFを添加する。次いで、“高”または“標準”開裂を、-5℃~0℃にて更に45~90分間該混合物を攪拌することにより行う。この“高”HF脱保護を行うのにより好ましい方法はイムノーダイナミックス社の方法である。この方法において、1mlのアニソール、0.4mlのDMS、0.4mlの1,2-エタンジチオールおよび3mgの2-メルカプトピリジンを10mlの新たな無水HFと共に添加して、この混合物を-10℃にて30分、0℃にて30分 (0℃にてアルギニン1個当たり5分以上) 攪拌する。該“標準”または“低/高”HF脱保護および開裂法のいずれかの完了後、HFおよび任意の残留DMSを-5~0℃にて真空下で完全に蒸発させる。次に、得られるペプチド樹脂-スキャベンジャー混合物を約10~15mlのジエチルエーテル、酢酸エチルなど (体積に制限はなく、ジエチルエーテルが好ましい) と混合し、濾過し、残渣を2~4回10~15mlのジエチルエーテル、酢酸エチルなど (体積は制限されず、ジエチルエーテルが好ましい) で洗浄して有機スキャベンジャーを除去する。この時点で、5mlの2-メルカプトエタノール (BME) と共に30分該残渣を攪拌して、メチオニンスルホキシドをメチオニンに還元することが好ましい。次に、このペプチドを2%のBME含有10~30%酢酸5~30mlで3回抽出し、この抽出液を併合し、(必要ならば) 水で希釈して酢酸の最終濃度を10%以下とし、次いで凍結乾燥する。得られる粗製ペプチドの重量は典型的には約50~90%の範囲にある。“低-高”HF開裂および脱保護の完了後、該ペプチドの好ましい抽出法はイムノーダイナミックス社の使用した方法である。この方法においては、HFとDMSの蒸発後、該ペプチド/樹脂混合物をクロロホルムで膨潤後、3回10mlのエーテルで洗浄し、5mlのBMEと共に20~30分攪拌する。次に、この混合物を3回5~30mlの1:1の10~30%酢酸/BMEで抽出した (しばしば、0.1%のTFA含有50%水性アセトニトリル20~30mlで更に抽出することが有利である)。次に、抽出物を併合し、20mlのエーテルで3回抽出して残留するスキャベンジャーを除去し、ペプチドを該水性酢酸/ (アセトニトリル) /B

ME層の凍結乾燥により回収する。このHF脱保護、開裂法から得た粗製ペプチドはN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチン弗化水素酸塩として存在し、また他の弗化物塩およびスキャベンジャーで汚染されている可能性もある (他の脱保護スキームを用いた場合には、例えばトリフルオロメタンスルホン酸を用いた場合には、他の無機塩、例えばトリフルオロメタンスルホネートが代りに存在するであろう)。このようなペプチドまたは無機塩は望ましくない。というのは、これら単独もしくは水分の存在下では、これらは強酸として作用する恐れがあり、該ペプチドを分解もしくは植物に対して有害である可能性がある。従って、更に精製してこのような塩を除去することが好ましく、これにより単位重量当たり高活性のペプチドを得ることも可能となる。このペプチドを精製する好ましい方法はアニオン交換クロマトグラフィーにより弗化物塩を除去し、次いでHPLC (高速液体クロマトグラフィー) により単離することである。本発明の実施に際して典型的に好ましい如く、アニオン交換クロマトグラフィーは該ペプチドを酢酸塩として与え、一方HPLCは該ペプチドをトリフルオロ酢酸塩として与える。イオン交換クロマトグラフィーを実施する典型的な方法は該粗製ペプチドを最小量の5~30%酢酸 (より高い酢酸濃度がより疎水性の高いペプチドに対して必要とされる) に溶解し、あらゆる残留不溶物 (例えば吸蔵樹脂) を濾別し、該溶液を5~30%酢酸中のアニオン交換樹脂、例えばバイオラド (BioRad) AG1X-8 (アセテート型) (カリフォルニア州、リッチモンドのバイオラド社) (BioRad Laboratories) に通すことである。ニンヒドリンテストで検出 (サリン (Sarin) 等の上記文献) したペプチド画分を併合し、凍結乾燥してペプチドをN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチン酢酸塩として、無機不純物を含まない状態で得る。しかし、依然としてスキャベンジャーが残されている可能性がある。こうして得たペプチドはHPLC分析 (以下参照) によれば純度50~80%であるが、それ自体は植物病原体を破壊する上で著しく有効である。単位重量当たり幾分高い活性をもつペプチドは該アニオン交換前またはその後に、該ペプチド塩を弱塩基、例えば5~10%の重炭酸アンモニウムまたは6Mグアニジン塩酸塩で処理して、酸性開裂条件下でセリンおよび/またはスレオニンを含むペプチド中で起こるすべてのN→Oアシルシフトを逆転させることにより得られる。典型的には、これは該ペプチド塩を5~10%重炭酸アンモニウムに溶解し、得られた溶液を15~25℃にて一夜放置し、次いで凍結乾燥により該ペプチドを回収することで達成される。いくつかの場合において、特にペプチド鎖の組立て中メチオニンがそのスリホキシドとして保護されている場合、該ペプチド混合物を再度還元剤で処理して、あらゆる残留メチオニンスルホ



キシドをメチオニンに戻すことが有利である。この目的のために文献中に多くの試薬が記載されているが、(例えばDTT(ジチオスレイトール)およびDTE(ジチオエリスリトール)、MMA(N-メチルカプトアセタミド)が好ましい。この還元は典型的には、1~5mg/mlの約10%w/vMMA溶液中のペプチドを10~30%酢酸中でインキュベート(12~48時間、20~40℃にて窒素雰囲気下で行う)することにより実施され、これはA. クリエル(Culwell)の"N-メチルメルカプトアセタミド(MMA)を用いるペプチド中のメチオニンスルホキシドの還元(Reduction of Methionine sulfoxide in Peptides Using N-methylmercaptoacetamide),"アプライドバイオシステムズ、ペプチドシンセサイザーユーザブレタン(Applied Biosystems Peptide Synthesizer User Bulletin)No. 17、(1987)、カリホルニア州、フォスターシティ法によって行う。この還元はHPLCにより監視でき、還元が完了した際に該インキュベーションは停止される。メチオニンスルホキシドのメチオニンへの還元は不要である。というのは、本発明者等はこのようなメチオニンスルホキシド含有ペプチドが植物病原体に対し活性をもつことを明らかにしたからである。しかし、単位重量当たり高い活性をもつペプチドはこの還元法を実施することにより得ることができる。ペプチドをMMAで処理した場合、過剰のMMAおよび関連する副生物を、5~30%酢酸に溶した該ペプチド混合物の溶液をセファデックスG-25カラム(ニュージャージー州、ピスカタウェイのファルマーシアルKBバイオテクノロジー社(Pharmacia LKB Biotechnology Inc.)に通すことにより除去し、かつ流出液を254nmで監視する。ペプチド含有画分を併合し、凍結乾燥により乾燥する。単位重量当たり最大の活性をもつペプチドは、これらを更にHPLCで精製することにより得られる。典型的には、1~2mlの0.1%TFA(トリフルオロ酢酸)中に溶解した該ペプチドを2.2×25cm、10μ、300Åビダック(Vydac)(マサチューセッツ、サウスボロのネストグループ(Nest Group))C-4カラムに注入し、0.1%TFA含有アセトニトリル-水の種々の勾配で溶出する逆相HPLCにより精製される。このようにして得られるペプチドはN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチントリフルオロ酢酸塩であり、これらは一般に215nmにおけるHPLC積分によれば純度95%以上である。該ペプチド画分の解析的HPLCは以下の如き溶出条件、即ち30分に亘るA中に0~60%のBを含むような線形勾配の下で、流量1.0ml/minを利用した、0.46×25cm、10μ、300Å、ビダック

C-4カラム上で、215mmにおけるUV吸収により監視しつつ行われ、ここで溶媒Aは0.1%TFA水性溶液であり、溶媒Bは0.08%TFAのアセトニトリル溶液である。殆どの場合、ペプチドの構造はアミノ酸分析または質量スペクトル分析で確認した。ペプチドのアミノ酸分析は、イオン交換カラム(例えば、ベックマンスフェロゲル(Beckman Spherogel)AA-Liカチオン交換カラムで100℃にて24時間6N塩酸で加水分解した後、ベックマンシステムゴールドアミノ酸アナライザ(Beckman System Gold Amino Acid Analyzer)(ベックマンインスツルメンツ社、カリホルニア、フラートン)を用い、ニンヒドリン検出を利用したHPLCにより行われた。アミノ酸分析も、イムノダイナミックスにより行われ、これはウォーターズアソシエーツピコータグシステム(Waters Associates Pico-Tag System、(ミリポア社(Millipore Corporation)、マサチューセッツ、ベッドフォード))上でアミノ酸をPTC(フェニルチオカルバミル)誘導体として検出された。このペプチドのアミノ酸分析は、またF. ウェスタル(Westall)等の"ペプチドの15分酸加水分解(Fifteen Minutes Acid Hydrolysis of Peptides),"Anal. Biochem., 1974, 61, pp. 610-613に記載の方法に従ってペプチド樹脂を使用して得た。これらの場合において、該ペプチド樹脂は塩酸単独の代りに1:1塩酸/プロピオン酸により加水分解される。生成する混合物は2~4容の洗浄用の水を使用して0.45μのナイロンフィルタを介して濾過し、濾液を凍結乾燥し、残渣を上記の如く分析した。該ペプチドのFAB-MS(高速原子衝突マスマススペクトル(fast atom bombardment-mass Spectrometry))からのスペクトルは、高エネルギーイオン生成にキセノンを用い、8KVおよび40μAの電流で動作するイオンテック(Ion Teck)BLNFサドルフィールドガン(saddled field gun)を備えたクラトス(Kratos)MS50RFマスマススペクトロメータを用いて得た。スペクトルは該ペプチドの4mM溶液1μlと40mM酢酸中の90%グリセリン1μlとをサンプルブローブの銅ターゲット上で混合することにより調製した溶液から得た。この装置はヨウ化セシウムで校正し、質量範囲約500原子質量単位から予想される質量の上下に走査当たり5~10秒の速度で走査させた。また、データはDS90データシステムとして得られるマルチチャンネルアナライザプログラムを用いて集め(M+H)<sup>+</sup>フラグメントを得た。

#### オリゴペプチドの化学的合成

ブリッジを含んでいようがいまいが、140アミノ酸ま

での長さの本発明に記載した型のオリゴペプチドの化学合成は、上でt-Boc側鎖保護法について記載した方法(クラーク・ルイス(Clark-Lewis)等

“造血細胞用のタンパク成長因子、インターロイキン-3の自動化学合成(Automated Chemical Synthesis of a Protein Growth Factor for Hemopoietic Cells, Interleukin-3),” *Science*, 1986, 231, pp. 134-139)を利用して達成できる。しかし、これらの方法は75アミノ酸までの長さのオリゴペプチドの合成について好ましく、また60アミノ酸までの長さのオリゴペプチドの合成により好ましい。ペプチドの合成のための“セグメント縮合(segment condensation)”法[E. T. カイザー(Kaiser)等, “セグメント合成縮合によるペプチドおよびタンパクの合成(Peptide and Protein Synthesis by Segment Synthesis Condensation),” *Science*, 1989, 243, pp. 187-192]も60~75アミノ酸の長さのオリゴペプチドの好ましい合成法であるが、76~104アミノ酸の長さのオリゴペプチドの合成にとってより好ましい。ペプチド合成のための“酵素的半合成(Enzymatic Semisynthesis)”法も、60~約120アミノ酸の長さのオリゴペプチド合成用の好ましいもう一つの方法である。例えば、V. デフィリッピス(DeFilippis)等、サーモリシンのカルボキシー末端フラグメントの半合成(Semisynthesis of Carboxy-Terminal Fragment of Thermolysin), “プロシーディングスオブザエレブンスアメリカンペプチドシンポジウム(Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium), ペプチド:化学、構造および生物学(Petides: Chemistry, Structure and Biology), (J. E. リバー(Rever)等), 1990, pp. 1051-1053, エスコム(ESCOM)刊、ライデン、ネザーランド; C. J. A. ワーローン(Wallone)等, “酵素的に活性化したフラグメントの縮合によるチトクロームの欠損ミュータントの半合成(Semisynthesis of a Deletion Mutant of Cytochrome by Condensation of Enzymatically Activated Fragments), *ibids*, (G. R. マーシャル(Marshall)), 1988, pp. 372-375; J. バンビンズバーゲン(van Binsbergen)等, “合成ペプチドのトリプシン-触媒カップリング:高収率でのホスホリ

バーゼA2ミュータントの半合成生産(Trypsin-Catalyzed Coupling of Synthetic Peptides: Semisynthetic Production of Phospholipase A2 Mutants in High Yield),” *ibid.*, pp. 381-382を参照のこと。これら方法の組合せの改良もより長鎖のオリゴペプチドの合成に利用できる。かくして、75アミノ酸までの長さのオリゴペプチドのセグメントは上記のように調製でき、次いで周期的にもしくはブロックとして、溶媒、例えばNMP、DMFまたはDMSO中でカップリング剤としてジフェニルホスホリルアジドを用いて相互に結合できる[T. シオリ(Shiori)等, “ジフェニルホスホリルアミド。改良クルチウム反応およびペプチド合成用の新規な便利な試薬(Diphenylphosphoryl Azide. A New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction and for the Peptide Synthesis),” *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, pp. 6203-6205]。縮合後に除去することのできるArg(NO<sub>2</sub>)およびLys(TFA)の使用が、この方法では好ましい。単一のペプチドモノマーのマルチマーは同様な方法で調製できる[H. R. バッタチャルジー(Bhattacharjee)等“L-ドーパ残基を含む生体接合性類似ポリペプチド:合成、重合および接合性(Bioadhesive Analogue Polypeptides Containing L-Dopa Residues: Synthesis, Polymerization and Adhesive Properties),” *Polym. Mater. Sci. Eng.*, 1980, 59, pp. 110-114]。オリゴマー化度は使用するジフェニルホスホリルアジドの量、または反応時間により制御できる。より高分子量のオリゴペプチドは水性溶媒に殆ど不溶であって、HPLCで精製できないので、カラムクロマトグラフィーで精製するか、あるいは混合物として直接使用する。

#### ジスルフィド結合オリゴペプチドの化学合成

Cys含有AMPPP、逆ペプチドおよびオリゴペプチドは、前の節で議論した同一のサイズ限界でここに記載した方法により合成できる。次いで、システインを選択的に酸化してジスルフィドブリッジ含有システインとする。この際、R. S. ホッジズ(Hodges)等の“モデル合成ペプチドを用いたペプチド設計(Peptide Design Using Model Synthetic Peptides),” *Peptide Res.*, 1988, 1, pp. 19-30に記載の方法を利用する。典型的には、システイン含有ペプチドの溶液をリン酸緩衝液(pH3~9、好ましくはpH

7) (触媒量(0.001~25%, 好ましくは1.0%)の銅(四塩、例えば塩化第二銅(0.001~0.5M、好ましくは0.05Mの磷酸モノナトリウム、 $10^{-5} \sim 10^{-4}$  Mの塩化第二銅、0.01~1Mの、好ましくは0.5MのNaClを含む)中で、室温にて一夜攪拌する。次いで生成するオリゴペプチドを精製する。

#### AMPPPの遺伝子的合成および精製

前に述べた如く、本発明によるAMPPP含有ペプチド、逆ペプチドリッジのあるもの、フラグメントおよびオリゴペプチドは、また宿主細胞中に適当な調節シグナル例えば遺伝子配列に付加された遺伝子プロモータおよび遺伝子ターミネータ配列をもつ1種以上のペプチドをコードするデオキシリボヌクレオチドまたはDNA遺伝子配列を挿入し、タンパク合成の生物的過程を通して宿主細胞中でこれらペプチドをコードする遺伝子配列を発現させることによって調製し得る。この方法に用いる宿主細胞は原核細胞(例えば、バクテリア細胞)または真核細胞(例えば、植物または動物細胞)起源のいずれであってもよい。大規模生産のために、バクテリアまたは酵母などの微生物宿主がこれら生物の発酵過程の進歩状態のために使用できる。また、他の遺伝子発現系をこれらペプチドの製造のために使用でき、これは例えば真菌(例えば、ニューロスボラ(Neuropsora)、培養ヒト細胞または昆虫細胞を含む。また、AMPPP含有ペプチドおよび特に本発明に記載したオリゴペプチドの遺伝子工学的合成は特に有用である。既に述べたように、あらゆるブリッジ含有分子を除き、約2~約16ペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドの製造にしばしば有用である。一般に、本発明で明らかにしたように、大きなオリゴペプチドの固層を基礎とする繰返し化学合成には技術的な限界があり、単一の合成では約140アミノ酸が実際上の限界である。前に述べたように、このサイズまでの化学的誘導されたペプチドを更に重合する化学的手段があるが、これらの化学的手段はこのようにして重合されるペプチドサブユニットの組成および数の正確な制御性に欠ける。従って、反復的化学合成によって可能となる以上に長いオリゴペプチドを生成する必要があるが、多くの重合生成物は余りに大きすぎるか、あるいは不適当なサイズであって、植物病原体に対し有効であり得ない。更に、本発明により例示される抗生物ペプチドは数10、数100あるいは数千もの長いアミノ酸残基の架橋をもつペプチドを配合でき、また遺伝子技術が規定されたサイズおよび組成の極めて長いオリゴペプチド並びにオリゴペプチドの合成に極めて適しているので、オリゴペプチドおよびモノマー型抗生物ペプチドの生物学的製造が、本発明の範囲内で有用な多量の抗生物ペプチドを得る手段として好ましい。正確に規定された組成の大きなオリゴペプチドをコードする完全合成遺伝子製造における進展した技術およ

び様々な生物学的機構によりかかるオリゴペプチドを安価に製造する手段における技術的進歩は、抗生物ペプチドの生物学的生産が未来におけるおよび低価値の作物種におけるAMPPPの生産などといったいくつかの例におけるより好ましい生産手段となり、また経済的に実施し得る唯一の利用可能な方法であり得る。AMPPPをコードする遺伝子は、例えば完全に化学的な合成手段で調製でき、あるいはペプチドをコードする天然配列由来の配列の一部または全部を含むことも可能である。完全にデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドの化学的合成は溶液化学の応用を通して達成でき、あるいは好ましくは固体担体上で実施できる。オリゴヌクレオチドのいくつかの合成化学が工夫されており、ホスホトリエステルの、ホスファイトトリエステルおよびホスホアミダイトケミストリーを含む。M. H. カルターズ(Caruthers), "デオキシオリゴヌクレオチドの新規な化学的合成法(New Methods for Chemically Synthesizing Deoxyoligonucleotides)", *Methods of DNA and RNA Sequencing*, (S. M. ワイズマン(Weizman)編、プラエガーパブリッシング社(Praeger Publishers), NY, 1983, pp. 1-22およびK. イタクラ(Itakura)等の"合成オリゴヌクレオチドの合成および利用(Synthesis and Use of synthetic oligonucleotides)", *Ann. Rev. Biochem.* 1984, 53, pp. 323-356参照。N, N-ジメチルアミノホスホラミダイトまたはβ-シアノエチルジイソプロピルアミノホスホラミダイトまたはデオキシリボヌクレオシドモルホリノ-メトキシホスフィンを含むようなホスホラミダイト合成化学が好ましい。というのは、成長中のオリゴヌクレオチド鎖へのヌクレオチドのカップリング効率がよく、しかも使用する化学試薬の安定性がよいからである。最も好ましいホスホラミダイト化学はβ-シアノエチル-ジイソプロピルアミノ-ホスホラミダイトを使用するものである。というのは、匹敵する中間体と比較して高い安定性を持ち、またチオフェノールなどの有害な試薬を使用しないからである。S. L. ビューケージ(Beaucage)およびM. H. カルターズ(Caruthers), "デオキシヌクレオシドホスホラミダイト-デオキシリボヌクレオチド合成用の新しい組のキー中間体(Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediate for deoxypolynucleotide synthesis)", *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, pp. 1859-1862; L. T. マクブライド(McBride)およびM.

H. カルターズ, "デオキシオリゴヌクレオチドの合成に有用ないくつかのデオキシヌクレオチドホスホラミダイトの研究 (An Investigation of several deoxynucleotide phosphoramites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides), " *ibid.*, 1984, 24, pp. 245-248; T. ドルバー (Dorper) および E. L. ウィナッカー (Wenuacker), "オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成用のホスホラミダイト法の改良 (Improvements in the phosphoremidite procedure for the Synthesis of oligodeoxyribonucleotides), " *Nuc. Acids Res.*, 1983, 11, pp. 2575-2584; および S. P. アダムズ (Adams) 等, "2種のDNA 51-マーの合成におけるヒンダードジアルキルアミノヌクレオシドホスファイト試薬 (Hindered dialkylaminonucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers), " *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, 105, pp. 661-663 参照。簡単にいえば、固体担体上のホスホラミダイト化学は固体材料、例えばガラス、シリカゲル、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリスチレン、ニトロセルロースおよびいくつかの他の一般に化学的に不活性な材料に変性ヌクレオチドを付加することからなる。該ヌクレオチド塩基中のヌクレオチドホスフェート基、およびあらゆる環外窒素原子は化学基で該担体上で保護されており、その結果該オリゴヌクレオチド鎖の線形延長中の望まぬ副反応が阻止される。このような付加は種々のリンカーまたはスペーサ部分を介して行うことができるが、好ましいリンカーは一般に長鎖アルキルアミンである。これについては M. D. マトゥシ (Matteucci) および M. H. カルターズの U. S. P. 4, 458, 066 を参照のこと。付加されたヌクレオチドは 5'-糖位置において酸置換活性ジメトキシトリチル化学基で保護され、この基を例えばベンゼンスルホン酸、トリクロロ酢酸またはジクロロ酢酸で除去して、カップリング用の遊離 5'-OH 基とし、かくして追加のヌクレオチドの結合を開始する。この脱保護または活性化工程で使用するものが好ましい酸はジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸である。次いで、固体担体に付加されたヌクレオチドと同様に保護されたホスホラミダイトモノマーヌクレオシドを弱酸の存在下で添加して該 5'-OH 基の該ホスホラミダイト試薬への求核攻撃を促進する。このカップリング工程によって好ましい弱酸はテトラゾール、アミン塩酸塩および 3-ニトロトリアゾールである。最も好ましい弱酸はテトラゾ-

ルである。次に、該担体上のカップリングしなかったサイトを遊離ヒドロキシル基の無水酢酸でアシル化して遮断または封止する。この遮断工程で好ましい補助試薬は 1-メチルイミダゾールである。天然のヌクレオチド間ホスフェートジエステル結合は後に、該固体担体上で成長しつつあるヌクレオチド鎖を柔和な酸化混合物で処理することにより、各ヌクレオチド添加サイクルにおいて発生する。この酸化工程はリン (III) をより安定なリン (V) 酸化状態に転化し、かつあらゆる後の脱保護工程または活性化処理において、酸種例えばジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸によるヌクレオチド鎖の切断を防止する。ヨウ素は酸素ドナーとしての水と共に酸化種として使用される。好ましい補助試薬はテトラヒドロフランおよびルチジンを包含する。該固体担体の無水アセトニトリルによる洗浄後、脱保護/カップリング/酸化/遮断サイクルを必要な回数繰返して選択されたオリゴヌクレオチドまたは複数のオリゴヌクレオチドを調製でき、各時点において、適当な保護  $\beta$ -シアノエチルホスホラミダイトヌクレオシドを用いて、プリンまたはピリミジン塩基を担持する選ばれたヌクレオチドを挿入する。このプリン塩基は、好ましくは該挿入されたヌクレオチド上のアデニンまたはグアニンであり、また該ピリミジン塩基は好ましくはシトシンまたはチミンである。オリゴヌクレオチドの化学合成の簡略さは研究室作業のための実際の案内の進展並びに市販の自動化された DNA 合成装置の一般的利用へと導く。M. H. カルターズ, "遺伝子合成装置: DNA 化学およびその利用 (Gene synthesis machines: DNA chemistry and its use), " *Science*, 1985, 230, pp. 281-285; および J. W. エフカビッチ (Efcavitch), "オリゴデオキシリボヌクレオチドの最適化化学合成用の自動システム (Automated system for the optimized chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides), " *Macromolecular Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications* [アラン (Alan) R. リス (Liss) 社, NY], 1988, pp. 221-234 参照。市販の装置はいくつかの製造もと、例えばデュポン社 (DuPont Company) (デラウェア、ウィルミントン)、ミリゲン/バイオサーチ社 (Milligen/Bioscience, Inc. (カリフォルニア、サンラファエル) およびアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems; カリフォルニア、フォスタシティ) から入手できる。本発明で使用する装置はバイオサ-

ーチ (Biosearch) 8700 または アブライド バイオシステムズの 391 PCR-MATE DNA 合成装置であった。これら装置の動作および該装置と共に使用する  $\beta$ -シアノエチルホスホラミダイト化学サイクルの詳細はバイオサーチ社のモデル 8600/8700 指示マニュアルまたは該 PCR-MATE モデル 391 DNA 合成装置ユーザーズマニュアル (アブライド バイオシステムズ パート No. 900936, バージョン 1.00, レビジョン A, 1985 年 5 月) に記載されている。オリゴヌクレオチドの最後のカップリングサイクルは、5' 末端ジメトキシトリチル基を残して又は離して完結することができる。好ましくは、ジメトキシトリチル基は、続いての完全な長さのオリゴヌクレオチドの精製に便利であるため、残される。完成され、保護されたオリゴヌクレオチドは精製の前に脱保護し、固体の支持体から開裂しなければならない。完成したオリゴヌクレオチドを有する固体支持体は、支持体樹脂からオリゴヌクレオチドを開裂するために、少なくとも 1 時間、新しい濃水酸化アンモニウムで室温で処理される。その後、固体支持体をより多い濃水酸化アンモニウムで洗浄し、合わせた濃水酸化アンモニウムを、保護された塩基から保護化学官能基を除去するために、シールされたバイアル中で、55~60℃で少なくとも 8 時間インキュベートする。その後、サンプルを冷却し、減圧下で蒸発乾固する。サンプルは、新しい濃水酸化アンモニウム又は少なくとも 95 容量%純度のエタノールから再蒸発させてもよい。その後、最終的なサンプルは、凍結 (乾燥) 状態で貯蔵することもでき、または滅菌蒸留水に再懸濁した後 -20℃で貯蔵することもできる。PCR-Mate Model 391 user's manual, supra, and M. H. Caruthers et al., "Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method," *Methods in Enzymology* 154, (1987), 287-313 参照。上記の好ましい選択から引用される方法により製造された任意の開裂された及び脱保護されたオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で公知の 1 又はそれ以上のいくつかの方法により精製される。これらの精製技術には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー及び疎水的相互作用クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような好ましい方法の一つは、直立した 12% ポリアクリルアミドスラブゲルによる、20×40×0.08 cm、7M 尿素、90 mM トリス-HCl、pH 8.3、90 mM ボレート、1-2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) ニナトリウム中の、5' 末端にジメトキシトリチル部分を欠くオリゴヌクレオチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動精製である。精製されるべき各オリ

ゴヌクレオチドの部分 (0.3-3.0 A<sub>2</sub>。単位) は、減圧下で蒸発乾固され、少なくとも 0.01% のブロモフェノールブルー及び少なくとも 0.01% のキシレンシアノールを含むホルムアミド: 1 mM の EDTA ニナトリウム (9 より大きい: 1) 中に再懸濁され、沸騰水浴中で 2~3 分間加熱され、氷スラリー中に即時に置かれ、そして個々のウェル (幅が少なくとも 6 mm) に置かれる。サンプルは、80~90 W で、陽極に向かって、ブロモフェノールブルーが少なくともポリアクリルアミドゲルの 2/3 の位置に移動するまで電気泳動にかけられる。その後、全長のオリゴヌクレオチドを、該ポリアクリルアミドゲルを、一片のサランラップのような柔軟な透明プラスチックラップに置き、これを、蛍光インディケーター化合物を含む薄層クロマトグラフィー板 (例えば Silica Gel F-254; Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA) の最上部におき、該ポリアクリルアミドゲルを短波長の紫外線照射下で調べることにより、可視化する。その後、全長バンド材料をポリアクリルアミドゲル中で切り出し、種々の方法、例えば緩衝液中のエレクトロエレーション又は単純な拡散によりゲルから精製することができる。好ましい抽出方法は、0.5 ml の 0.3 M 酢酸ナトリウム、pH 7.5 への振盪しながらの拡散、及び続いてのフェノール: クロロホルム (1:1, v:v) による抽出及びエタノール沈殿である。その後、沈殿したオリゴヌクレオチドを適当な容量 (通常 10~1000  $\mu$ l) の適当な緩衝液、例えば 10 mM の トリス-HCl, pH 7.5, 1 mM の EDTA ニナトリウムに、又は滅菌蒸留水に再懸濁し、-20℃で貯蔵することができる。"Purification of oligonucleotides using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis" in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., Eds., (1989) のユニット 2.21 参照。さらに好ましい別の精製方法であって、5' 末端にジメトキシトリチル部分を有するオリゴヌクレオチドの精製に非常に適するものは、逆相 HPLC カラム上での高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) である。そのような逆相 HPLC カラムには、種々のシリカ又は下記のような多くの業者から購入しうる樹脂をベースとするポリマーを詰めることができる: Millipore/Waters (Milford, MA), The Nest Group (Southboro, MA), Rainin Instrument Company, Inc. (Woburn, MA), J. T. Baker Inc. (Phillipsburg, NJ), Alltech Associates Inc. (Deerfield, IL), 又は

Pierce Chemical Company (Rockford, IL)。オリゴヌクレオチドは、載置され、分画され、そして前記HPLCカラムから例えばいくつかの適当な非破壊(non-destructive)緩衝液のいずれか中のアセトニトリル勾配により溶離される。好ましいアセトニトリル勾配は、0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート、pH7.0緩衝液中、5%~40%の範囲、好ましくは5~30%の範囲である。好ましくは逆相HPLCカラムは、これに結合した直鎖アルキル部分、例えば炭素原子数4、炭素原子数8又は炭素原子数18のアルキル鎖を含む。その後、精製された全長オリゴヌクレオチドを含む適当なフラクションを集め、減圧下で蒸発させ、3%(v/v)の酢酸水溶液中に室温で10~30分間で再懸濁させる。その後、脱トリチル化オリゴヌクレオチドをエタノール沈殿させるか、又は他の適当な手段、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより精製する。さもなければ、全長脱トリチル化オリゴヌクレオチドは、種々のタイプのカラム及び勾配材料を用いてHPLCにより精製することもできる。G. Zon及びJ. A. Thompson, "A review of high-performance liquid chromatography in nucleic acids research," *BioChromatography* 1, (1986), 22-32参照。別のより好ましい方法は、疎水的相互作用クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの精製である。本発明の目的のためのこの精製技術は、常圧下で疎水樹脂による逆相クロマトグラフィーの形態である。水酸化アンモニウム脱保護及び開裂溶液中の粗生成物であるオリゴヌクレオチド混合物は、適当な緩衝液、例えば1.0Mのトリエチルアンモニウムアセテート、pH7.0中で平衡にした疎水性樹脂に加えられる。その後、結合したオリゴヌクレオチドを2%のトリフルオロ酢酸に1~3分間暴露することにより脱トリチル化され、その後、水中の15~40%のアセトニトリル中で回収される。その後、回収されたオリゴヌクレオチドは凍結乾燥され、上記のように適当な緩衝液又は滅菌蒸留水中に再懸濁される。本発明の目的である部分的又は完全な合成遺伝子を製造するのには、1又はそれ以上の合成オリゴヌクレオチドが必要であろう。任意の適当なオリゴヌクレオチド及び/又は天然マギニン遺伝子のような天然遺伝子の部分もしくは全部は、加熱、尿素もしくはホルムアミドのようなカオトロピック剤との混合、又はアルカリ溶液への暴露のような手段によるDNAの変性により、1又はそれ以上のAMP PPをコードする遺伝子に集められうる。ホスフェート部分は、所望により、それらを欠く任意のDNA又はオリゴヌクレオチドに、T4ポリヌクレオチドキナーゼのような酵素を用いて酵素的に結合されうる。Current Protocols in Molecula

r Biology, supra. のセクション3.10参照。本発明の範囲内の、追加の任意のDNAの存在下又は不存在下における遺伝子の製造において使用される任意のオリゴヌクレオチドは、その後、適当な手段、例えば室温への徐冷又はカオトロピック剤を除去するための透析により再結合又はアニーリングされる。これらのアニーリングされたDNAは、適当な酵素、例えばT4 DNAリガーゼで処理することにより共有結合されうる。前記のCurrent Protocols in Molecular Biology, supra. のセクション3.14参照。必要な場合及び適当な場合には、この手段により製造されたペプチドをコードする遺伝子生成物を、製造者の仕様書による制限エンドヌクレアーゼで処理することにより、又は当該技術分野で知られた方法により、遺伝子調節DNA配列に加えるために、製造することもできる。前記のT. Maniatis et al., *Molecular Cloning*, pp. 104-106参照。上記の方法は、本発明による大部分の又は全ての抗菌性ペプチド、例えばRAM PP又はRAMP PP及びオリゴペプチドをコードする遺伝子の製造のためにしうる。ペプチド及びオリゴペプチドをコードする遺伝子を製造するための別の方法を使用することもできる。この方法には、個々のペプチドサブユニット又は個々のサブユニットの群をコードするアニーリングされたDNA、例えばブリッジ分子(bridging molecules)をコードする遺伝子セグメントを製造することが含まれるであろう。関連する個々のアニーリングされたDNAの全てを結合することから製造されうるコンボジット遺伝子がインターラプションなしに所望のペプチドをコードするかぎり、少なくとも二つあるアニーリングされたDNAは、各々より小さいペプチドサブユニットの部分にコードすることも可能である。アニーリングされたDNAの末端は、異なるDNA配列の末端の間のオーバーラッピングする相補的な短いDNA配列の結合を可能にするように選択される。より後の工程で、適当なDNAはアニーリングされ、連結されて、ペプチド又はオリゴペプチドをコードするより大きな遺伝子を形成する場合には、これらの結合部位は、少なくとも一つのペプチドサブユニットのコード領域を次のペプチドサブユニット又は関連するブリッジ分子にインターラプションなしに維持する。例えばオリゴペプチドをコードするより大きな遺伝子の種々の部分をコードする二つ以上のDNAセグメントは、所望の最終的なオリゴペプチドのサイズ及び組成に依存して、適当なDNAコード配列を維持するような付着が考慮されうる。より小さなDNAセグメント上のオーバーラッピング及び相補的末端の領域は、偶然起こる望ましくない二つ以上のDNAセグメントの結合を妨げるように同等でないように選択されうる。これらのオーバーラッピング末端は、プリカーサーであるアニーリングさ



れたDNAを、上記の遺伝子調節DNA配列に追加されるDNAの製造において記載した制限エンドヌクレアーゼにより処理した生成物と同等でも同等でなくてもよい。本発明の範囲内のより大きなオリゴペプチドをコードするより大きなDNA断片に結合される予定の上記のアニーリングされたDNA断片は、いくつかの手段、例えば変性方法の逆転の前の加熱又はアルカリ溶液への暴露により穏やかにアニーリングすることにより結合される。アニーリング工程は、好ましくは、工程中に実質的に個々のアニーリングされたDNAを変性しない。アニーリングされたDNAは、その後、適当な酵素、例えばT4 DNAリガーゼで処理することにより共有結合される。適当なDNAセグメントは、同時に又はブロックで互いに結合され、続いて少なくとも一つの追加の結合工程が起こり、より大きなオリゴペプチドをコードする最終的なDNA断片が形成される。最終的なDNAフラグメントを得る前に、DNAセグメント結合のための追加のサイクル又は工程が必要とされる場合は、連結の中間段階で得られる結合されたDNAセグメントは、標準的な手段、例えばゲル電気泳動による精製、サイズ排除クロマトグラフィー及び／又はエタノール沈殿により精製されるべきである。前記のCurrent Protocols in Molecular Biology, supra. の第2章参照。その後、より大きなオリゴペプチドをコードする最終的なDNAフラグメントに、上記の遺伝子調節DNA配列を付加することもできる。定められた宿主細胞においてタンパク質として発現することができるようにするために、ペプチドをコードする遺伝子に付加される遺伝子調節シグナルは、宿主細胞の生物機構により認識され、宿主細胞内のDNAポリメラーゼによりDNA配列のメッセンジャーRNA配列(mRNA)への転写を誘導するDNA配列である、遺伝子プロモーター配列を含みうる。その後、このmRNAは、宿主細胞内のリボソーム上でタンパク質生成物に翻訳されることができなければならない。遺伝子プロモーター配列は、上記の転写及び翻訳の理論に適合する限り、一部又は全部が、宿主細胞のものとは似ていない細胞に見出されるプロモーター配列から誘導される。例えば、グラム陽性菌であるBacillus subtilisからの増殖遺伝子(vegetative gene)プロモーター配列は、グラム陰性菌であるEscherichia coliにおけるペプチド遺伝子の発現に満足なものでありうる。1以上のAMPPPの発現のためのAMPPP遺伝子に追加される第二の遺伝子調節因子は、遺伝子ターミネーター又はポリアデニル化配列である。このDNA配列は、さらに転写することを阻害し及び停止させ、真核細胞の場合には1以上のアデノシンヌクレオチドをmRNAの3'末端に直接付加する情報を提供する遺伝情報を含む。遺伝子ターミネーター配列は、宿主細胞のゲノム由来又は宿主細胞内

での転写を適当に終了させることが有効であることが知られている非類似の細胞のゲノム由来のターミネーター配列の一部又は全部を含む。そのような配列の例は、Salmonella typhimurium his operon rho-独立転写ターミネーター配列でありうる(例えばN. E. Winkler, Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology [F. C. Neidhardt, Ed-in-chief: American Society for Microbiology, 1987], 第25章参照)又はAgrobacterium tumefaciens Tiプラスミド由来のオクトピンシンターゼターミネーター配列(例えばH. DeGreve等, "Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene", J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 499-511参照)。ペプチド発現遺伝子又は遺伝子調節シグナルが付加された遺伝子は、好ましくは、関連遺伝子によりコードされるAMPPPを含む1以上のペプチドを発現する目的のために原核生物又は真核生物由来の宿主細胞に導入される。導入手段は当該技術分野でよく記載されており、遺伝子発現が要求されている宿主細胞のタイプに依存する。例えば、バクテリア細胞の外部から供給されたDNA、例えばEscherichia coliの細胞による形質転換は、塩化カルシウム法により達成される。典型的には、遺伝子調節シグナルが付加されたペプチド遺伝子は、形質転換法の前に適当な形質転換ベクターに共有結合される。そのようなベクターは、Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses by R. L. Rodriguez及びD. T. Denhardt (Butterworths, Boston; 1988)に記載されている。T. Maniatis等, Molecular Cloning, supra, p. 247-255。好適な宿主細胞中でこのような遺伝子発現系で一旦発現されると、ペプチドは通常的手段により抽出されてもよく、且つ／または精製されてもよく、部分的に精製された形態または実質的に精製された形態で植物病原体に対して使用し得る。ペプチドを宿主細胞から抽出する方法は、宿主細胞の熱及び／または酵素による溶解、脂質溶媒または水性／有機ミセル溶液中の可溶性、並びに宿主細胞をフレンチプレスにより押しつけることによる細胞膜及び／または細胞壁の加圧断裂を含む。宿主細胞としての細菌の場合に関する細胞溶解に好ましい方法は、求められている生産の規模に依存す



る。大規模の生産に関して、細菌細胞の熱または加圧断裂が好ましい。例えば、H. Hellebust, "Different approaches to stabilize a recombinant fusion protein", Bio/Technology 7, (1989), 165-168を参照のこと。抽出されたAMPPPは、更に精製しないでそれらのそのままの形態で使用されてもよく、またはサイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー等の如き方法による細胞内容物の1回以上の分別の適用により部分的または完全に精製されてもよい。その他の可能性は、ベプチドを暗号化するこれらの遺伝子を発現し、且つAMPPPをタンパク質生産物として発現するための宿主受容体として全能植物細胞を使用することであり、それにより植物細胞は稔性作物を再生し得る。この後の場合、受容体植物は遺伝的に形質転換された植物またはトランスジェニック植物と称される。外来遺伝子を植物に導入するには、幾つかの既知の方法がある。選択の方法は、主として、形質転換される作物の種類に依存する。しかしながら、これらの方法の多くが本発明により使用し得る。双子葉植物中へのDNAの移入に特に有効である一つの方法は、アグロバクテリウムの使用を伴う。この方法では、関係する遺伝子(例えば、カリフラワーモザイクウイルス35S5'プロモーター領域及び3'OCスターミネーター領域を有するAMPPPの遺伝子)が選択遺伝子(例えば、トランスポゾンTn5のネオマイシンホストトランスフェラーゼII(nptII)、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ等を暗号化する遺伝子)で小さい組換えプラスミド中にスライディングされたT-DNA領域の境界の間に挿入される。次いで組換えプラスミドが直接の形質転換または三親交配によりアグロバクテリウム宿主に導入される。次いで、関係する遺伝子を有するアグロバクテリウム株が、細菌を2~3日の期間にわたって植物飼料(例えば、葉盤)で同時培養することにより双子葉植物組織の形質転換に使用される。形質転換された細胞は適当な薬剤による選択により回収され、次いで植物が再生し得る。R. B. Horshら著、"A Simple and General Method of Transferring Genes into Plants", Science 227, 1985, 1229-1231を参照のこと。植物細胞、特に更に扱い難い単子葉作物の植物細胞の形質転換に使用されたその他の方法は、化学的に誘導される移入(例えば、ポリエチレングリコールによる; H. Lorzら著、"Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation", Mol. Gen. Genet. 199, (1985), 178-182を参照のこと)、

バイオリスティックス(bioplastics)(W. J. Gordon Kammら著、"Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants", The Plant Cell, 2, (1990), 603-618)、マイクロインジェクション(G. Neuhausら著、"Transgenic rapeseed plants obtained by microinjection of DNA into microspore-derived proembryoids", Theor. Appl. Genet., 74, (1987), 30-36)、及びその他(I. Potrykus, Bio/technology 9, (1990), 535-542)を含む。Bascombらの上記の文献に記載されているように、天然に産出されるタンパク質はアミノ末端またはN-末端に結合されたMetアミノ酸をしばしば含む。これらのメチオニンは時々ホルミル化される("fMet"と称される)。それ故、本明細書に開示されたタンパク質はまたN-末端に付加されたメチオニンまたはN-ホルミル化メチオニンを含んで生産されることがある("Met-タンパク質と称される)。

#### シグナルペプチド

病原体は通常細胞、特に植物組織を細胞の外部の場所から攻撃するので、宿主植物細胞を保護することを目的とするタンパク質は細胞から分泌されることを必要とする可能性がある。これは、ターゲッティングペプチドとして文献に知られているペプチド配列(G. von Heijne "The Signal Peptide" J. Membrane Biol. 115, (1990), 195-201; S. F. Nothwehr及びJ. I. Gordon著、"Targetting of Proteins into the Eukaryotic Secretory Pathway: Signal Peptide Structure/Function Relationships" Bioassays, 12, (1990) 479-484; 並びにK. Verner及びG. Schatz著、"Protein Translocation Across Membranes", Science, 24, (1988), 1307-1313)をペプチドのN-末端に付加することにより達成し得る。ターゲッティングペプチドまたはシグナルペプチドは、その他のペプチドまたはタンパク質のN-末端に結合される場合に、そのペプチドまたはタンパク質を特定の細胞下の区画、好ましくは細胞外の空間に向けるのに役だつものである。本発明のターゲッティングペプチドまたはシグナルペプチドの例は、ニンジンエクステンシンのペプチド(SEQ ID NO. 21)(J. Chen及びJ. E. Var

ner 著, "An Extracellular Matrix Protein in Plants, Characterization of a Genomic Clone for Carrot Extensin" *Embo J.*, 4, (1985) 2145-51) 及びオオムギ $\alpha$ -アラミラーゼのペプチド (SEQ ID NO. 22) (J. C. Rogers 及び C. Milliman 著, "Isolation and Sequence Analysis of a Barley Alpha-Amylase cDNA Clone" *J. Biol. Chem.* 258, (1983), 8169-74; T. H. D. Ho. ら著, "Regulation of Gene Expression in Barley Aleurone Layers", *Molecular Biology of Plant Growth Control*, Alan R. Liss, Inc., (1987), 35-49 頁; C. R. P. Knox ら著, "Structure and Organization of Two Divergent Alpha-Amylase Genes from Barley", *Plant Mol. Biol.*, (1987), 9, 317; 並びに B. Khursheed 及び J. C. Rogers 著, "Barley Alpha-Amylase Gene; Quantitative Comparison of Steady-State mRNA Levels from Individual Members of the Two Different Families Expressed in Aleurone Cells", *J. Biol. Chem.*, 263 (1988), 18953-18960) である。ニンジンエクステンシンシグナルペプチドが本発明に使用するのに好ましい。上記の文献に記載された理由から、ターゲッティングペプチドは、通常、そのN-末端に付加されたメチオニンまたはホルミル化メチオニンを有する。本発明のペプチドまたはオリゴペプチド (そのN-末端に結合されたメチオニンまたはホルミル化メチオニンを含み、またはそれらを含まない) へのターゲッティングペプチドの付加は、ペプチドの効力に影響すべきではない。何となれば、ターゲッティングペプチドは、通常、細胞外の空間への輸送中にプロテアーゼによりペプチドから開裂されるからである。AMPPPのN-末端に付加されたシグナルペプチド配列を含む本発明の範囲内のペプチドの例は、(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 1); (SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 6); (SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2); (SEQ ID NO. 21) - (S

EQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 1); 及び (SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - [(SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 5)], - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 10); (この場合、(SEQ ID NO. 5) に関して  $Xaa^1 - Xaa^5$  は Gly である) である。上記のオリゴペプチドのシグナルペプチドが発現及び細胞外の空間への分泌後に開裂される場合、放出されたオリゴペプチドは微生物病原体による宿主植物の侵入の際に有効である。

#### ペプチド及びオリゴペプチドの用途

本発明により具体化された抗生物質ペプチドは、微生物の増殖または生存を抑制することが所望される幾つかの日常の状況で広い用途をもち得る。本発明者らは、植物の微生物病原体により生じた作物の破壊の経済的影響を軽減することにより作物の収穫量を高めることに於ける AMPPP の適用に特に関心がある。しかしながら、本発明の AMPPP はまた微生物により引き起こされるヒトまたは動物の病気の治療に於ける医薬品、貯蔵または輸送中の食品保存の目的のための食品添加物、家庭用もしくは医療用の消毒剤、または化粧品、医薬品もしくはその他の製品の防腐剤として有益であり得る。本発明の AMPP または AMPPP は、これらの状況のいずれか、または全てに於いて、それ自体で、またはヒト、動物もしくは植物の微生物病原体に対して有効であるその他の化学化合物もしくは製薬化合物と組み合わせて有益であり得る。

#### ペプチド及びオリゴペプチドの外部適用

本発明のペプチド及びオリゴペプチドの外部適用が、例えば、病原体に対して植物を保護するのに使用される場合、使用される AMPPP は  $1 \sim 1000 \mu g/ml$  の AMPPP を含む液体溶液または懸濁液を生成するように希釈されるか、またはダストとして適用されるように希釈剤固体と混合されることが予想される。適用の正確な性質は、標的とされる特別な病原体に一部依存する。特定の作物及び病原体への適用の一般的な方法を採用するための詳細な方法は、*Methods For Evaluating Pesticides For Control of Plant Pathogens*, K. D. Hickey 編集, The American Phytopathological Society (St. Paul, MN), 1986 に見られる。本発明のこの特徴により特に有益であると予想される適用の方法は、全体の植物またはその部分の断続的な水性または非水性のスプレー、種子被覆、及び灌漑系 (例えば、温室ミストベンチ) 中の混入を含む。その製剤に添加し得るアジュバントは、可溶化を助けるための薬剤、湿潤剤及び安定剤、またはマイクロカプセル化さ

れた製品を製造する薬剤を含む。その薬剤は、高濃度の無機塩、特に二価のカチオン、例えば $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 、または $\text{Fe}^{++}$ を含まないことが好ましい。また、外部適用は、生存可能な形態の組換え微生物またはAMPPPを失活しない方法により生育し得ない形態に変換された後の組換え微生物を使用し得る。生存可能な組換え微生物がAMPPPを送出するのに使用される場合、それらが標的植物を集落形成する能力を有することが好ましい。

培養植物細胞によるペプチドの植物毒性スクリーニング  
Bascombらの上記の文献は、分離された植物葉緑体を使用する抗菌ペプチドに関するスクリーニング技術を開示していた。葉緑体に対するこれらの抗菌ペプチドの効果は、植物組織中の特別なペプチドの存在及び可能な発現と関連する潜在的な植物毒性の一般的な指示であった。また、Bascombらの上記の文献は、最小のレベルの植物毒性を有する抗菌ペプチドを使用することが望ましいことを開示していた。しかしながら、このスクリーニング技術は植物毒性の指標として幾つかの利点を有するが、それは葉緑体の収集及び使用を必要とする点で不便である。更に、そのスクリーニング法は植物毒性の一般的な指標としてのみ意図されるという事実のため、生じたデータは、AMPPP RAMPPPまたはオリゴペプチドを使用しようとする特定の植物細胞または植物組織に対する毒性を必ずしも予測しない。詳しくは、葉緑体に対する特別な抗菌ペプチドの植物毒性作用は、葉緑体の特異な構造及び膜の化学的性質のために、化学的に類似しない植物の原形質膜またはその他の細胞下の細胞器の膜に対する抗菌ペプチドの植物毒性の指標では必ずしもないのである。本発明者らは、従来の植物毒性スクリーニング法よりも更に有効である培養植物細胞を使用する新規なスクリーニング法を発見した。何となれば、それは分離された葉緑体の使用を必要としないからである。更に、本発明のスクリーニング技術は、例えば、宿主細胞の膜の化学的性質に対する抗菌ペプチドの植物毒性作用の更に正確な反映である。更に、本発明により使用される代謝終点は、分離された葉緑体アクセスにより測定されるような酸素発生ではなく、酸素消費である。それ故、種々の代謝経路に於ける種々の抗菌ペプチドの植物毒性の影響に関するデータを得ることが、本発明の使用により可能である。本発明のアクセスが植物細胞に関して説明されるが、その技術はその他の型の細胞にも同様に適用し得ることが理解される。本発明のこの特徴の別の利点は、特定の宿主植物細胞に関して特定の抗菌ペプチドの植物毒性作用を試験する能力である。それ故、特別な抗菌ペプチドを発現し得る遺伝子を含む特別な遺伝子型の遺伝子導入トウモロコシを生産しようとする場合には、遺伝子操作の前にトウモロコシ植物細胞に関してこのペプチドの植物毒性作用を試験することが可能である。それ故、潜在的な宿主細胞及び／

または宿主組織と抗菌ペプチドの適合性が推定される。植物細胞に関して、植物細胞または植物組織に対するペプチドの相対的な植物毒性の目安は、細胞懸濁液として正しく維持された細胞培養物に対してペプチドを試験することにより測定し得る。培養された全細胞懸濁液は、細胞懸濁液を開始し、維持するための通常の方法、例えば、the Handbook of Plant Cell Culture, 1~3巻、(マクミラン・パブリッシング社(Macmillan Publishing Company)、ニューヨーク、NY、1983-84)に説明されているような方法を使用して生成し得る。植物毒性応答は、酸素消費に関する特別なペプチドの効果を観察することにより細胞系中で実証し得る。特に、次第に増加する濃度のそのペプチドを測定数の懸濁細胞でインキュベートすることが減少された酸素消費をもたらすことが実証し得る場合には、用量応答関係があらゆるペプチドに関して推定し得る。同様に、次第に増加する数の培養全細胞による単一濃度のペプチドのインキュベーションが酸素消費の総合の減少された抑制をもたらすことが実証し得る場合には、容量応答関係が所定のペプチドに関して推定し得る。キュベットアッセイが、これらの測定に一般に使用される。全細胞の酸素消費の抑制率(%)を実際に試験するためにキュベット中に使用される溶液は、単に、ペプチドが添加される水を含んでもよく、または、それはペプチドが添加される通常の溶液(その中で、細胞懸濁培養物が生育される)からなっているもよい。これらの溶液は、蔗糖、グルコース、フラクトース、キシロース及びアラビノースの如き糖を含んでいてもよい。無機塩、例えば、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、ホウ酸、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、リン酸カルシウム、塩化コバルト、硫酸第二銅、エチレンジアミンテトラ酢酸、塩化第二鉄、クエン酸第二鉄、硫酸第二鉄、酒石酸第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、硫酸マンガン、三酸化モリブデン、モリブデン酸、塩化ニッケル、硫酸ニッケル、塩化カリウム、ヨウ化カリウム、硝酸カリウム、リン酸カリウム、硫酸カリウム、硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硝酸亜鉛、及び硫酸亜鉛のあらゆる組み合わせが含まれていてもよい。同様に、有機物、例えば、活性炭、アデニンヘミスルフェート、アミノ安息香酸、6-ベンジルアミノプリン、D-ビオチン、パントテン酸カルシウム、塩化コリン、ジメチルアリアルアミノプリン、葉酸、グリシン、インドール-3-酢酸、ミオイノシトール、インドール-3-酪酸、キネチン、 $\alpha$ -ナフタレン酢酸、ニコチンアミド、ニコチン酸、ペプトン、ピリドキシンHCl、リボフラビン、チアミンHCl、ビタミンA、ビタミンB12、及びビタミンDのあらゆる組み合わせが含まれていてもよい。上記の薬剤のいずれか、または全部の混合物が有益であ

り得る。含まれる場合、夫々の薬剤の濃度は一般に0～1モルの量で存在する。また、溶液pHを4～9の好ましい範囲に維持するために、緩衝剤が細胞溶液中に含まれていてもよい。これらの緩衝剤の例は、トリス（トリスー〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン）、MES（sー〔Nーモルホリノ〕エタンスルホン酸）、酢酸塩、及びHEPES（Nー〔2ーヒドロキシエチル〕ピペラジンーNー〔2ーエタンスルホン酸〕）である。使用される場合、これらの緩衝剤は一般に約0.01%～約10%（w/v）の量で存在する。上記の植物毒性アッセイで試験される細胞懸濁液の全容積は10μl～1mlの範囲であり得る。本発明に有益な細胞の実際の量は、キューベツト当たりのごくわずかな数の細胞の少ない量から、キューベツトのサイズ及びマグネチックスターラによる細胞懸濁液の一定の攪拌の必要性により制限される多い量までの範囲であってもよい。試験し得る細胞の最小数は、記録できる量の酸素を消費する数である。この消費は、当業界で利用できる種々の技術及び装置、例えばワーブルグ（Warburg）装置または、好ましくは、酸素電極により監視し得る。"The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis", D. Walker, 1987, Hansatech Ltd., Kings Lynn, Norfolk, 英国を参照のこと。また、本発明によれば、試験のために植物細胞原形質体を使用することが可能である。本発明に使用される原形質体は、その細胞壁が除去された植物細胞である。これは、リグナーゼ、セルラーゼまたはその他の既知の酵素の使用により酵素により行うことができ、または浸透圧衝撃と組み合わせた組織スライシングの如き機械的手段により行うことができる。分離された原形質体の使用は、測定のための試薬として原形質体を調製するのに必要とされる追加の時間及び労力を除いて、本発明のスクリーニング技術の利点の多くの実現を可能にする。更に、細胞壁と特別な抗菌ペプチドとの間の潜在的な相互作用を測定する能力の欠如がある。下記の実施例は、本発明の概念を更に説明する目的のために示される。それらは、限定することを目的としない。これらの実施例は、RAMPPP及びオリゴペプチドを含む幾つかのペプチドに関するものである。便宜のため、これらのペプチドを、表1に同定された化合物を表すのに使用される任意の数で指定した。

【表1】

【表2/】

【実施例】

#### 実施例1：ペプチドNo. 5の調製

ABIモデル430Aペプチド合成装置を用い、t-Boc保護基、NMP中のDCC/HOBT生成した活性

エステル並びに側鎖保護基としてGlu(OBzl)、His(Bom)、Lys(Cl-Z)およびSer(Bzl)を使用してt-Boc-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂を調製した。この合成は0.5mM(740mg)t-Boc-Ser(Bzl)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(置換度=0.68mM/g)から開始し、該樹脂を該装置により利用される標準的NMP/t-Boc化学サイクルに従って反復的脱保護、中和およびカップリング工程に付した。各カップリング工程の終了時点で、該樹脂の試料をニンヒドリン監視のために採取(上記のサリン(Sarin)等の文献参照)したところ、各工程で98.4%以上のカップリング効率を示した。該樹脂の約2/3をMag2-OH(ペプチドNo. 11:実施例13)および(Mag2)-(Gly)-OH(ペプチド6:実施例2)の合成で使用するために取り出した。次に、t-Boc-(Mag2)-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の合成を同様な方法で完了したが、最後の19アミノ酸の合成にはダブルカップリングを利用した。t-Boc-(Mag2)-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の収量は0.690gであった。該N-末端t-Boc基はTFAを使用して該ペプチド合成により除去し、また該ペプチドを次に脱保護し、かつ以下の低/高(low/high)HF法を利用して該樹脂から開裂した。即ち、0.39gのペプチド-PAM樹脂混合物を0℃にて2時間、1.0mLの無水HF、2.6mLのDMSおよび0.4mLのp-クレゾールを含む溶液と共に攪拌した。該HFおよびDMSを蒸発させた後、該ペプチド樹脂混合物を、-10℃で30分および0℃で30分、新たな7mLのHF、0.5mLのアニソール、0.3mLのDMS、0.2mLの1,2-エタンジチオールおよび3.0mg2-メルカプトピリジンを含む溶液と共に攪拌した。HFおよび他の揮発分を蒸発させた後、該樹脂をクロロホルムで膨潤し、この混合物を3回5mLのエーテルで洗浄し、3mLのBMEと共に30分攪拌し、3回3mLの1:115%酢酸/BMEでおよび15mLの0.1%TFAを含む50%水性アセトリル溶液で1回抽出した。水性抽出液を併合し、10mLのエーテルで3回抽出し、凍結乾燥して、152mg(約65%)のペプチド混合物を得た。この粗製ペプチドを約4mLの1N酢酸(1%のBMEを含む)に溶解し、1N酢酸中の2.6×10cmのバイオラド(Bio-Rad)AG1X-8イオン交換カラム(アセテート型)に通して、弗化物塩を除去し、該ペプチドを酢酸塩形に転化した。ニンヒドリン監視(上記のサリン(Sarin)等の文献参照)により検出された該ペプチド画分を併合し、凍結乾燥して122mgのペプチドを得た。次に、このペプチドを40mLの10%重炭酸アンモニウムに溶解し、室温にて、窒素雰囲気下で24時間攪拌した。この溶液を凍結乾燥し、得られた残渣を

繰り返し1% BMEを含む1Nの酢酸から凍結乾燥して、最終的に199mgのペプチドを得た。最終的な精製は、ペプチド(10-15mg)を2.2×25cm、10μ、300Åのビダック(Vydac) C-4カラムに繰り返し注入し、60分に渡りA中にBを0%-60%の線形勾配で含む溶出液で溶出した。流量は6.0ml/minであり、溶媒Aは0.1% TFAであり、溶媒Bは0.08% TFAのアセトニトリル溶液であり、監視は235nmのUVを使用して実施した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、51.7分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度95%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は4917.3であり、実測値は4917.8であった。

#### 実施例2: ペプチドNo. 6の調製

t-Boc-(Mag2)-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(680mg)を実施例1と同様にして調製し、残りのペプチドは同様な手順で結合させたが、第2のMag2単位のアミノ酸はダブルカップリング法を利用して付加した。t-Bot-(Mag2)-(Gly)<sub>5</sub>-(Mag2)-OCH<sub>2</sub> PAH樹脂の収量は737mgであった。t-Boc基の除去後、実施例1と同様の手順を利用して563mgの該ペプチドを脱保護および開裂すると204mgの粗製ペプチドが得られた。この物質を実施例1と同様にイオン交換すると、168mgのペプチドが得られ、これは実施例1におけるように重炭酸アンモニウム処理した後に205mgのペプチドを与える。最終的な精製は実施例1と同様に分取HPLCを利用して実施したが、10-20mgの注入および以下のプログラムを使用した。即ち、60分に渡りA中に20%のBを含む溶出液からA中に40%のBを含む溶出液への線形勾配で溶出し、次いで20分間A中に40%のBを含む溶出液で溶出した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、69.3分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度85%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は5202.6であり、実測値は5201.6であった。

#### 実施例3: ペプチドNo. 7の調製

t-Boc-PGL-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を0.5mM(661mg)のt-Boc-Leu-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(置換度=0.76mM/g)から、実施例1の手順を利用し、11番目のアミノ酸以降はダブルカップリング法を利用して調製した。PGL-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の収量は1.61gであった。t-Boc基の除去後、この樹脂1.59gの脱保護および開裂を、18.0mlの無水HF、1.5mlのアニソール、0.6mlのDMS、0.3mlの1,2-エタンジチオールおよび3.0mgの2-メルカプトピリジンを含む溶液中

で、-10℃にて30分間および0℃にて30分間攪拌することにより実施した。0℃にて該HFおよびDMSを蒸発させた後に、該ペプチド/樹脂/スクャベンジャー混合物を15mlの冷99:1エーテル/BMEで3回洗浄して、スクャベンジャーおよび他の副生成物を除去した。得られた残渣を5mlのBMEと共に攪拌し、次いで10mlの15%酢酸/2%BMEで3回抽出した。該抽出物を併合し、続いて20mlのエーテルで2回抽出した。次に、該酢酸層を凍結乾燥して、粗製ペプチド559mg(71%)を得た。実施例1におけるようにイオン交換し、かつ酢酸アンモニウムで処理した後、最終的な精製を実施例1における如く分取HPLCにより実施したが、40分に渡るA中に24%Bを含む溶出液からA中に44%Bを含む溶出液への勾配を使用した。恐らく該ペプチドのペンタトリフルオロ酢酸塩形にある、27.1分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度98%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は1970.2であり、実測値は1970.1であった。

#### 実施例4: ペプチドNo. 8の調製

t-Boc-R-Mag2-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を0.5mM(653mg)のt-Boc-Gly-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(置換度=0.77mM/g)から、実施例1の手順を利用して調製した。但し、t-Boc-[Ala<sup>15</sup>-Gly<sup>23</sup>]R-Mag2-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の調製後、該樹脂の約半分を、R-Mag1-OH(ペプチド#18)の合成で使用するために取り出した。t-Boc-R-Mag2-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の収量は1.17gであった。t-Boc基の除去後、この樹脂の脱保護および開裂を、実施例3に記載の手順を利用して実施して粗製ペプチド473mg(76%)を得た。実施例1に記載の如く該物質200mgをイオン交換し、次いで重炭酸アンモニウム処理すると、158mgのペプチドが得られた。最終的な精製を実施例1における如くHPLCにより実施したが、40分に渡るA中に24%Bを含む溶出液からA中に44%Bを含む溶出液への勾配を使用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、27.9分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度98%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は2467.4であり、実測値は2467.5であった。「R-Mag2」はマガイニン2のRAMPPPを表す。

#### 実施例5: ペプチドNo. 9の調製

t-Boc-Met-(Mag1)-(Mag1)-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を0.5mM(714mg)のt-Boc-Ser(bzl)-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(置換度=0.71mM/g)から、実施例1の手順を利用して調製したが、第一のマガイニン1単位をもつ構築体以降

の該樹脂の約半分をMag 1-OH (ペプチドNo. 2) の調製で使用するために取り出し、かつアミノ酸の残りはダブルカップリング法を利用して結合させた。t-Boc-Met-(Mag 1)-(Mag 1)-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の収量は1.50gであった。t-Boc基の除去後、この樹脂の脱保護および開裂を実施例1の手順を利用して実施して、粗製ペプチド796mg (82%) を得た。実施例1におけるようにイオン交換し、かつ重炭酸アンモニウムで処理した後、最終的精製を実施例1における如くHPLCにより実施したが、60分に渡るA中に27%Bを含む溶出液からA中に47%Bを含む溶出液への勾配を使用した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、42.4分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度97%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は4933.3であり、実測値は4931.9であった。

#### 実施例6: ペプチドNo. 12の調製

t-Boc-Met[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を0.61mM (763m) のt-Boc-Pro-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(置換度=0.80mM/g) から、実施例5の手順を利用して調製したが、該樹脂の約半分はフラグメントt-Boc-(9-23)[Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の合成後に除去した。合成が完了した後、t-Boc基を除去すると、1.366gのMet[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂が得られた。この樹脂719mgの脱保護および開裂を実施例1の手順を利用して実施して、粗製ペプチド25mgを得た。実施例1におけるようにイオン交換した後、該ペプチドを実施例1の手順でHPLCで精製した。但し、40分に渡るA中に24%Bを含む溶出液からA中に44%Bを含む溶出液への勾配を使用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、34.1分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度95%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は2612.4であり、実測値は2612.0であった。

#### 実施例7: ペプチドNo. 13の調製

t-Boc-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を0.606mM (0.758g) のt-Boc-Pro-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(置換度=0.80mM/g) から、実施例1の手順を利用して調製した。この合成の完了時点において、該ペプチド樹脂の約2/3を除去し、実施例9、10および11で使用するために残しておいた。残りの1/3をt-Boc-Cys(4-MeBzl)とカップリング、TFA脱保護に付して所定のCys(4-MeBzl)-Pro<sup>2,3</sup>-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂を得た。次いで、これ

を実施例1に記載の低/高HF法を利用して脱保護並びに開裂して、260mg (73%) のペプチドを得た。このペプチドは実施例1に記載のように酢酸塩形状に転化した。最終的HPLC精製は実施例1に記載の如く実施したが60分に渡るA中に25%-45%のBを含む線形勾配の溶出液を使用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、49.1分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度90%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuで表わした理論値(M+H)<sup>+</sup>は2584.4であり、実測値は2583.9であった。

#### 実施例8: ペプチドNo. 14の調製

このペプチドダイマーはペプチドNo. 13の酸化(Hodges)等の上記の文献参照)により、即ちペプチドNo. 13(3.2x10<sup>-4</sup> M; 10mg/ml)をCu<sup>2+</sup>を含む燐酸緩衝液(0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.6x10<sup>-5</sup> M CuCl<sub>2</sub>; 0.5M NaCl; pH=7.0)に溶解した溶液を空气中で一夜(12-20時間)室温の下で攪拌することにより調製した。次に、該濃縮した反応混合物をセファデックスG-25カラム(2.6x25cm)に通し、10%酢酸で溶出することによりこの溶液を脱塩した。最終精製はペプチドNo. 16につき上記した分取HPLCにより実施した。

#### 実施例9: ペプチドNo. 15の調製

所定のペプチド-PMA樹脂(1.05g)を、実施例7で調製したt-Boc-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の約1/3から、ダブルカップリング法および実施例13記載の手順を使用して調製した。t-Boc基を除去した後、脱保護および開裂を実施例1の手順を利用して実施して、粗製ペプチド562mg (84%)を得た。実施例1記載の如くイオン交換およびHPLC精製を実施した。但し、60分に及ぶ、A中の40%B含有溶出液からA中に60%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、43.8分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度95%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

#### 40 実施例10: ペプチドNo. 16の調製

t-Boc-P1-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂(1.40g)を、実施例7で調製したt-Boc-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag 1-OCH<sub>2</sub> PAM樹脂の約1/3から、ダブルカップリング法、Trp(CHO)および実施例1記載の手順を使用して調製した。t-Boc基を除去した後、681mgのペプチド樹脂を、実施例1に記載の手順(但し、該高HF溶液に3mgのスカトールをも添加した)に従って脱保護および開裂を実施して、粗製ペプチド347mgを得た。このペプチ



ドを実施例1記載の手順でイオン交換クロマトグラフィーおよび重炭酸アンモニウム処理により精製した。40分に及ぶ、A中に30%Bを含む溶出液からA中に65%Bを含む溶出液までの濃度勾配を利用して、2.2mX25cm、300Åのビダック(Vydac)C-18カラム上でのHPLC(流量は1ml/min)によりこの生成物の分析を実施した。この分析は、恐らく該ペプチドのデデカトリフルオロ酢酸塩形にある主ピークが19分に溶出されることを示した。構造はFAB-MSにより確認した。

#### 実施例11: ペプチドNo. 17の調製

実施例1記載の手順を使用してt-Boc-Metをダブルカップリングして、実施例10で調製した740mgのt-Boc-Pl-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂とした。t-Boc基を除去した後、実施例10の手順で741mgの該ペプチド樹脂を脱保護かつ開裂して305mg(66%)の粗製ペプチドを得た。該ペプチドの精製は実施例1の手順で実施したが、60分に及ぶ、A中の35%B含有溶出液からA中に55%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのドデカトリフルオロ酢酸塩形にある、57.5分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度90%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

#### 実施例12: ペプチドNo. 18の調製

t-Boc-R-Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(930mg)を実施例4で調製したt-Boc-[Ala<sup>1,6</sup>-Gly<sup>2,3</sup>]R-Mag2-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の残りから、実施例1記載の手順で調製した。t-Boc基を除去した後、実施例1の手順で920mgの該ペプチド樹脂を脱保護かつ開裂して296mgの粗製ペプチドを得た。該ペプチドの精製は実施例4の手順で実施したが、A中の20%B含有溶出液からA中に40%Bを含む溶出液への濃度勾配を利用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、30.2分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度97%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

#### 実施例13: ペプチドNo. 11の調製

t-Boc-Met[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Des Ser<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂を0.6mM(923mg)のt-Boc-Lys(C1-Z)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(置換度=0.65mM/g)から、Arg(Mts)および実施例1の手順を利用して調製したが、フラグメント[Glu<sup>8</sup>-Lys<sup>2,2</sup>, Des Ser<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の合成後、その約2/3を除去した。この合成の終了時点で、t-Boc基の除去後、622mgの[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Des Ser<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂を得た。この物質593mgを、実施例3記載の手

順を利用して脱保護および開裂し、237mg(73%)の粗製ペプチドを得た。実施例1記載のイオン交換クロマトグラフィーおよび重炭酸アンモニウム処理後、最終的精製を実施例1記載の手順に従ってHPLCにより実施したが、40分に及ぶ、A中の25%B含有溶出液からA中に45%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、32.6分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度96%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は2515.4であり、実測値は2515.7であった。

#### 実施例14: ペプチドNo. 1, 2, 3, 4および10の調製

マガニン2-OH(ペプチドNo. 1)およびマガニン2-OH(ペプチドNo. 2)はアプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems Inc.: カリフォルニア州フォスターシティ)から購入するか、バスコム(Bascomb)等の上記の文献に記載の方法により製造した。[Glu<sup>8</sup>]Mag2-OH(ペプチドNo. 10)はバスコム(Bascomb)等の上記の文献に記載の如く調製した。セクロピン(Cecropin)A-NH<sub>2</sub>(ペプチドNo. 3)はカリフォルニア州、トーランスのスターバイオケミカルズ社(Star Biochemicals, Inc.)からそのトリフルオロ酢酸塩として購入した。セクロピンP1-OHとしても知られるP1-OH(ペプチドNo. 4)はカリフォルニア州、ベルモントのペニンシュララボラトリーズ社(Peninsula Laboratories, Ins.)から購入した(カタログ#6300)。

#### 実施例15: ペプチドNo. 19の調製

t-Boc-Ser-Mag2を実施例1におけるように調製したが、11番目のアミノ酸以降はDMF中でのDCC-促進対称無水物形成プロトコールおよびダブルカップリング法を利用した。この樹脂875mgを実施例3と同様にして脱保護および開裂して、360mgの粗製ペプチドを得た。実施例1記載の方法を使用してイオン交換し、かつ重炭酸アンモニウム処理した後該ペプチドをA. クルウール(Culwell)の上記の方法を使用して、N-メチルメルカプトアセタミド(MMA)により還元した。得られた油状残渣の10%酢酸/1%BME溶液を1ml/minなる流量にて、2.6X70cmのセファデックスG25カラムに通し、254nmにて該流出液を監視することによりペプチド画分を検出した。これら画分を併合し、凍結乾燥して殆ど定量的収率でMMA遊離ペプチドを得た。最終的な精製は実施例1の手順を利用してHPLCにより実施したが、40分に及ぶ、A中の22%B含有溶出液からA中に42%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該



ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、31.7分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度90%以上であることが示された。構造はアミノ酸分析により確認した。

#### 実施例16：抗真菌性バイオアッセイ

真菌を適当な培地（ここではポテトデキストロース寒天プレート）中で数週間育成した。該育成期間の終了時点で、該プレートに約5mlの無菌蒸留水を流して胞子を収穫した。この胞子濃度を血球計を使用して測定し、この胞子懸濁液を必要となるまで4℃にて無菌管内に保存した。次いで、82μlのポテトデキストロースブロスおよび3μlの胞子懸濁液（全体で $10^5 \sim 10^7$ の範囲内の胞子）をテストすべき各AMP PPについて、96ウェルのマイクロタイタプレートの12ウェルに添加した。単一の実験内に、各AMP PPに対して、12ウェルからなる1～4の同型培養セットを調製した。数例において、1より大きな胞子濃度を使用して、標的胞子の数の関数として或るAMP PPの有効性を測定した。各AMP PPの原液は濃度1mg/mlで調製し、各ペプチド原液0～15μlを該マイクロタイタプレートの各ウェルに添加し、次いで十分な容量の水を添加して、全ウェル容積を100μlとした。テストしたペプチドは実施例1～5、7、9、10、12、14および15に記載の如く調製もしくは入手した。アッセイした典型的なペプチドの体積は0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10および15μlであり、これらは0～150μg/mlの範囲の最終ペプチド濃度に相当する。該マイクロタイタプレートをパラフィルムで封止し、室温にて48時間インキュベートした。4Xおよび/または10Xの対物レンズを使用して顕微鏡により該真菌の成長を24および48時間後に観察した。胞子の発芽量および真菌の成長を、+および-系を使用して各観測時間における定量的測定値として記録した。[-]は発芽が生じなかったことを示し、[+]は膨張した発芽管を有する膨潤胞子を意味し、[++]は粗い格子の全体的な出現を伴う菌糸成長の初期を意味し、[+++]は厚い不透明な網模様の全体的な出現を伴う高密度の菌糸成長を意味する。次いで、各テストされたAMP PPのMCIC値を記録した。ここで、MCIC値とは胞子の発芽が生じないペプチドの最低の濃度（評価=[-]）として定義される。表2には、処理後24時間において、テストした2または3種の植物病原性真菌の各々に対し、各AMP PPを使用した少なくとも3種の同型培養物から算出した平均のMCIC値（μg/mlで表示）を掲載した。テストした植物病原性真菌はP3フサリウム（*Fusarium*）（野外で単離）、トリコデルマリーセイ（*Trichoderma reesei*）（イリノイ州、ベオリアのUSDA-ARSのDr. ジョンエリス（John Ellis）から入手）、セルコスボラ（*Cercospora*）sp.

（デラウェア州、ニューワーク、デラウェア大学のDr. ジェームズホーク（James Hawk）から入手）およびヘルミントスボリウムカルボヌム（*Helminthosporium carbonum*）であった。

#### 【表3／】

【表4／】テストした殆どのペプチドは低濃度（70μg/ml未満）で4種の異なる病原体の成長を阻害する上で有効であった。該ペプチドの殆どは、真菌に対する活性とはほぼ同程度にバクテリアEcc SR319（以下参照）に対しても活性であった。しかし、ペプチドNo. 7、8、15および18はEcc SR319に対するよりも一層真菌に対して高い活性を有していた。

#### 実施例17：抗菌性バイオアッセイ

エルウイニアカロトボラカロトボラ（*Erwinia carotovora carotovora*）菌株SR319（Ecc SR319）（ペンシルバニア州、フィラデルフィアUSDA-ARSのDr. C. H. リアオ（Liao）から入手）をルリアベルタニ（Luria-Bertani（“LB”））ブロス寒天プレート上に塗布し、28℃にて一夜育成した。24時間後、該寒天プレートから白金耳一杯分のEcc SR319を取り出し、栓付きの無菌の10ml試験管内のLBブロス（溶液1l当たり10gのバクトートリプトン、5gのバクトイースト抽出物、および10gの塩化ナトリウムを含み、オートクレーブ処理して滅菌）3mlに添加した。この培養物を一夜育成した後、ダイナテック（Dynatech）MR600マイクロプレートリーダー（バージニア州、アレクサンドリアのダイナテックラボラトリーズ社（Dynatech Laboratories, Inc.））を使用して630nmにおける光学密度を記録した。この一夜培養物の一部をルビアブロスで調整して630nmにおける光学密度0.2を有する培養物を得た。この培養物約250μlを栓付きの無菌の10ml試験管内のルビアブロス2250μlに添加し、この希薄培養物を振盪インキュベータで28℃にて三～四時間、新たに育成した培養物の630nmにおける光学密度が0.2となるまで育成した。この中対数増殖期にある培養物の一部をルビアブロスで1000倍に希釈して、培養物1ml当たりコロニー形成単位約 $10^5$ なるおよその濃度とした。この希薄培養物約85μlを、単一の実験内の各AMP PPに対して調製された12ウェルからなる3種の同型培養セットを有する96ウェルをもつマイクロタイタプレートの各ウェルに添加した。各AMP PPの原液は1mg/mlの濃度で調製し、各ペプチド原液1～15μlを該マイクロタイタプレートの各ウェルに添加し、次いで十分な量の水を加えて全ウェル体積を100μlとした。アッセイした典型的なペプチドの体積は0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10および15μlであり、これらは

0~150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲の最終ペプチド濃度に相当する。該マイクロタイタプレートにパラフィルムで封止し、振盪台上で28℃にて44時間インキュベートした。各Ecc SR319培養ウエルの光学密度を20時間後、次いで44時間後に記録した。次に、最小完全阻害濃度(MCIC)を、バクテリアの育成が観測されなかった種々のペプチド濃度を各同型培養セットに対して測定した。表3には、各AMP PPについて実施した少なくとも3回の同型培養実験から、処理の20時間後に観測した平均のMCIC値( $\mu\text{g}/\text{ml}$ で表示)を掲載した。テストしたAMP PPは実施例1~5、7、9、10、12、14および15に記載のように調製もしくは入手した。

【表5/】

【表6/】ペプチドNo. 7、8、15及び18を除き、テストしたペプチドの殆ど全てがEcc SR319の成長抑制において有効であった。先の4種のペプチドは1ml当たりペプチド150  $\mu\text{g}$ よりも高い濃度においてさえEcc SR319に対して活性ではなかった。ペプチドNo. 5、6、9及び16は、1ml当たり同じ $\mu\text{g}$ の量でテストした場合に、元のモノマー(ペプチドNo. 1、2、4及び12)の活性よりも少くとも良好な活性を示した。

**実施例18: 植物毒性に対する酸素発生バイオアッセイ**  
酸素電極において使用する葉緑素の調製用の以下の方法はグプタ(Gupta)等のPlant Physiol., 1989, 89, pp. 735-761に記載の「葉緑素被膜-結合 $\text{Mg}^{+2}$ の測定アッセイとしてのクロロテトラサイクリン蛍光の発展と利用(Development and Use of Chlorotetracycline Fluorescence as a Measurement Assay of Chloroplast Envelope-Bound  $\text{Mg}^{+2}$ )」と題する論文に記載のものと同様である。ホウレン草(スピナシアオレラセア(spina cea oleracea) L. var. "メロディー(Melody)")を育成チャンバー内で1:1ビート/ひる石注封混合物中で10時間明所にて育成した。このチャンバーの温度は該育成期間を通して日中は21℃に、また夜は16℃に維持した。全ての植物は6~8週の後葉緑素の単離に利用した。葉緑素に富む画分を得るために、約12gの葉脈を除いたホウレン草の葉を十分に洗浄し、表面を乾燥させた。次に、この葉を各々約1/2インチ平方の小片に細断し、50mlの冷却したホモジネーション用媒体(0.33Mのソルビトール、50mMのヘベス(Hepes)-NaOH, pH 6.8, 2mMの $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、1mMの $\text{MnCl}_2$ および1mMの $\text{MgCl}_2$ )を含む小さなブレンダージャーに入れた。該組織をブレンダー中で高速で3秒の間隔で2度混合した。得られたホモジネートを4層のチー

ズクロスおよび2層のミラクロス(miracloth; カリフォルニア州、ラジョラのベアリングダイアグノスティクス(Behring Diagnostics))を通して濾過し、これを2個の冷却した30mlのガラス製遠心管に導いた。この濾過した溶液を、ベックマン(Beckman)J2-21M遠心機(ニュージャージー州、ソマーセットのベックマンインストルメンツ社(Beckman Instruments, Inc.))内のスイングローター中で750g(2,200RPM)にて1.0分遠心処理した。次に、得られた上澄をデカンテーションし、0で攪拌してベレットを穏やかに再懸濁させた。約15mlのホモジネート用媒体を葉緑素の各試験管に添加し、次いで該葉緑素を30mlのガラス製遠心管内の40%パーコール勾配(6mlのPercoll, 9mlのホモジネート用媒体および0.03gの牛血清アルブミン)上に層状にのせた。これらの遠心管をベックマンJ2-21M遠心機内のスイングローター中で2500g(4,000RPM)にて4.0分遠心処理した。上澄を取り出し、生成ベレットを少量のホモジネート用媒体(約500 $\mu\text{l}$ )中に再懸濁した。ブラスチド濃度は、一般にクロロフィルを基にして表示した。クロロフィルはアーノン(Arnon)のPlant Physiol., 1949, 24, pp. 1-15に記載の「単離クロロプラストにおける銅酵素、 $\beta$ -ブルガリス中のポリフェノールオキシダーゼ(Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts, Polyphenol Oxidase in Beta Vulgaris)」と題する文献中の方法により測定される。約50 $\mu\text{l}$ のクロロプラスト原懸濁液を10mlの80%アセトンに添加し、この溶液を5分間暗所でインキュベートし、次いでベックマンGP遠心機で500g(1630RPM)にて5.0分間遠心処理した。このアセトン-クロロプラスト溶液の吸光度を645nm、663nmおよび730nmで追跡した。次に、クロロフィル濃度を $10 \times [(645\text{nmにおける吸光度} \times 20.2) + (663\text{nmにおける吸光度} \times 8.02) - (730\text{nmにおけるバックグラウンド})]$ として計算した。これは、元の50 $\mu\text{l}$ のクロロプラストに対する $\mu\text{g}$ で表したクロロフィルの量を与えた。このクロロプラストの濃度を、次にホモジネート用媒体で調整し、50mlの懸濁液が26 $\mu\text{g}$ のクロロフィルを含有するようにした。これらのクロロプラストは1-1/2~2時間に渡り活性であるにすぎないので、即座に使用した。酸素電極(イングランド、ノーホーク、キングズリンのハンザテックインストルメンツ(Hansatech Instruments)製)を使用して、単離されたクロロプラストの酸素発生を測定した。この方法の詳しい議論についてはD. ウォーカー(Walker)の「光合成の簡単な測定における酸素電極および蛍光プローブ

の利用(The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis)」と題する上記の文献を参照のこと。飽和KCl溶液を該電極のウエルに入れ、1インチ平方の圧延紙またはレンズ紙を、該紙がKClを吸収し、かつイオンブリッジを形成するように該電極ウエルに設置した。表面に触れないように注意して、1インチ平方のテフロン膜を調製し、該浸漬紙を覆うように配置した。膜アプリケーションを使用して、Oリングを該電極の頂部上に配置し、かくして紙と膜とが該電極を確実に横切るようにした。CB-1D制御箱に通電して、該系を約1時間ウォームアップした後校正した。この系の温度は循環水浴で20℃に維持した。次いで、この系を空気で飽和した水中の酸素濃度が267nM/mlであると仮定して、脱イオン水の激しく攪拌した洗浄ビンからの空気で飽和した水を使用して校正した。ゲインスイッチを使用して、後に出力をチャートレコーダのベンが最大チャート高さとなるように設定した。該容器中の水から全ての空気を除去し、かつ該チャートレコーダの0設定を実施するために、約2~3mgのナトリウムジチオナイトを添加し、該プロットペンをグラフの底部分にまで移動するか否かを観察した。線の傾きが不安定な場合には、該膜および紙を取り外して該酸素電極の設定を再度行う。この酸素電極を使用して植物毒性のバイオアッセイを実施するために、該酸素電極容器に以下の成分を加えた。即ち、830μlのアッセイ媒体(25mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を添加したpH7.6に調整したホモジネート用媒体)、50μlの0.1Mの新鮮なNaHCO<sub>3</sub>、20μlのカタラーゼ(全体で49.6単位/μl)および50μlのクロロプラスト懸濁液(最後に添加)。次に、該電極用の光源を点灯した。初期誘導期は平衡化されたクロロプラスト系であるとした。この初期誘導期が1分以上である場合には、クロロプラスト単離に使用した該植物は不十分であると判定された。酸素発生性の実験においては、定常的な酸素発生速度が3~4分で達成された。次いで、50μlのペプチド含有溶液をハミルトン(Hamilton)注射器を使用して添加した。酸素発生速度はペプチド添加3分後に監視した。ペプチド添加後のこれらの実験における酸素発生速度の低下は、該ペプチド添加前の該チャートレコーダ出力線の勾配と、該ペプチド添加後の設定点における該線の勾配と比較することにより決定した。得られた結果をクロロフィル含有量に対して規格化した。というのは、実験間でクロロプラスト濃度に幾分差があったからである。これらの速度は1時間当たり、クロロフィル1mg当たりの酸素のμMとして表した。最終結果を酸素発生阻害率(%)で表示した。該阻害率は、該ペプチド添加後の酸素発生速度を、酸素発生初期のコントロール速度で割り、100

を掛け、更に100%から得られた%を引くことにより導かれる。表4には、最終濃度8μMでペプチドに暴露したクロロプラストに対して、いくつかのAMPPPに見られた結果をまとめた。該ペプチドは実施例1~5、7、9、10、12、14および15に記載の如くして調製もしくは入手した。平均値および標準偏差を、各AMPPPについて実施した8~10回の同型培養アッセイから算出した。コントロール酸素発生速度は72~283μM O<sub>2</sub>/クロロフィル時/mgの範囲内であった。結果における日々の変動を最小化するために各実験では多数のペプチドの実験を実施した。

【表7/】

【表8/】種々のペプチドにより、広範囲に渡る酸素発生阻害率が観測された。特にペプチドNo. 3、5、6、9、13、15および16は全て、該実験を実施した各時点における酸素発生阻害率を生じた。対照的に、ペプチドNo. 8、即ち逆マガイニン2(reverse Magainin 2)は天然のマガイニン2と比較して極めて低い植物毒性作用を示した。マガイニン2の配向の逆転は、抗真菌活性を維持するが、抗菌活性を失わせる(即ち、ペプチドNo. 1に対して、ペプチドNo. 8の植物毒性を実質的に減じる)。本特許に包含される実施例に記載したように、このペプチドと他のペプチドとの結合は協働的な抗真菌活性および抗菌活性とを有するが単一のペプチド単独よりもずっと低い植物毒性を有する混合体を与えることができた。

#### 実施例19: 全細胞植物毒性スクリーニング技術

トウモロコシBMS懸濁細胞による酸素消費を、抗生物質ペプチドの相対的な植物毒性の指標として測定した。ブラックメキシカンスイート(BMS)細胞懸濁培養物の維持は、25mlの該細胞培養物を、培養開始3日後に栓付無菌250ml三角フラスコ中の25mlの新鮮なMSA2D培地(ムラシゲ&スコーグ(Murashige and Skoog)基本塩混合物、カタログNo. M5524の4.4gボトル、100mgのmyo-イノシトール150mgのL-アスパラギン、30gのスクロース、20mlの0.1mg/ml 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸原液および、25mg/100mlのバントテン酸カルシウムと、50mg/100mlのピリドキシンと、50mg/100mlのニコチン酸と、50mg/100mlのチアミンと、200mg/100mlのグリシンとを含む1mlのビタミン原液(該成分を全て滅菌した蒸留水1lに添加し、次いで25分121℃にてオートクレーブ処理して得られる))に移すことにより行った。4日後に、該細胞培養物の12.5mlを新鮮なMSA2D培地35.5mlに移した。移動管理期間を3~4日に変えることにより、培養物を連続的に維持した。この培養物を弱い光の下で室温にて125RPMにて振盪した。酸素消費実験のため

に、細胞を新鮮な培地に移してから1日後に使用した、細胞を滅菌した50 mlの遠心管に注ぎ、重力により沈降させた。使用済の培地を取り出して7.8 mlの新鮮なMSA 2 D培地を該沈降細胞1 gにつき添加した。この細胞原液を連続的な通気のために振盪機に設置し、当日に実施した全てのアッセイで使用した。酸素電極（イングランド、ノーホーク、キングズリンのハンザテックリミテッド（Hansatech Limited））を腐食がないか否かについて検査した。次いで、飽和KCl溶液を清浄な電極ウエルに入れた。1インチ平方の圧延紙またはレンズ紙を切り出し、該紙の端部がKClを吸収しイオンブリッジを形成するように該ウエル上に配置した。表面に触れないように注意して1インチ平方のテフロン膜を切り出し、浸漬した圧延紙上に設置した。膜アプリータを使用して、リングを該電極の頂部上に圧接し、かくして紙と膜とが該電極を確実に横切るようにした。CB-1 D制御箱（ハンザテックリミテッド（Hansatech Limited））に通電して、該系を約1時間ウォームアップした後校正した。このCB-1 D制御箱の出力を1 Xに設定した。チャートレコーダをチャート速度3 cm/minとなるようにその入力を0.05 Vに設定した。20℃に維持した循環水浴を該電極チャンバーに取りつけた。次いで、この系全体を、蒸留水を含む洗浄ピンを激しく攪拌して得た空気で飽和した水を使用して校正した。ゲインスイッチを使用して、出力をチャートレコーダのペンが最大チャート高さ（900=頂部）となるように設定した。空気中飽和した水中の酸素濃度は20℃にて276 nM/mlであると仮定した。約2~3 mgのナトリウムジチオナイトを添加することにより、該容器中の水から全ての空気を除去した。該チャートレコーダのペンをグラフの底部分にまで移動することにより応答させた。線の傾きが不安定な場合には、該膜および紙を取り外して該酸素電極の設定を再度行う。1 mlのアッセイに対して、該酸素電極容器に888  $\mu$ lの水と62.5  $\mu$ lのBMS原細胞懸濁液とを添加した。このアッセイで使用する細胞の最終濃度は約8 mg/mlであった。該細胞による酸素消費速度は該チャートレコーダで3分間追跡した。次に、ペプチド50  $\mu$ lをハミルトン注射器を使用して該容器に添加した。（ペプチド原液は50  $\mu$ l中に所定の濃度を放出するように調節した）。酸素消費はペプチドの添加後5分にて追跡した。完全なテストに必要な時間は8分であった。ペプチドの添加後酸素消費の抑止時間は、ペプチド添加前のグラフ上の線の傾きを、ペプチド添加後の設定点におけるグラフ上の線の傾きとを比較することにより決定した。該ペプチドの添加後の酸素消費速度を、酸素消費の初期コントロール速度で割り、次いで100を掛けた。次に、この%を100%から差引き、酸素消費の%阻害率として表された最終の結果を得た。平均値および標準偏差を、各AMP PPを使用して

実施した4~5個の同型培養アッセイから算出した。テストしたAMP PPは実施例1、4、および14に記載のようにして調製もしくは入手した。結果を表5に示す。

【表9/】ペプチドNo. 1は、逆ペプチドNo. 8と比較して、より高い酸素消費の阻害率を生じた。この結果は、ペプチドNo. 1の配向の逆転がクロロブラストの酸素発生に及ぼす植物毒性を実質的に減じることを示した前の実施例（実施例18の表4を参照のこと）と一致している。ペプチドNo. 2およびペプチドNo. 4に対する結果は単離されたクロロブラストに及ぼす比較的低い植物毒性作用（実施例18の表4を参照）と比較して、全細胞に及ぼすより大きな全体的な植物毒性が存在することを示している。この結果は驚く程のことではない。というのは、全細胞はより複雑であり、多数の代謝経路を有し、該経路がペプチドに影響される可能性があるからである。ペプチドNo. 1のモノマーを含むオリゴペプチドであるペプチドNo. 5は該元のモノマーと比較してそれほど違った植物毒性に及ぼす作用をもたなかった。

#### 実施例20：蛋白分解劣化に対する耐性の測定

ペプチドの細胞外植物プロテアーゼに対する感受性を測定するために、およびこれらのプロテアーゼによるプロセッシングサイトを決定するために、ある系を設計して、トウモロコシ、タバコまたはジャガイモの葉から細胞外流体を得、またこれらを種々のペプチドの安定性のテストのために使用した。タバコの葉を脱イオン水で洗浄した後、該葉から葉脈間部分を細断することにより細胞外流体（ECF）を得た。該セグメントを真空デシケータ中で水に浸し、5~10分間真空を印加した。真空を徐々に解除して、該葉を拭き取って乾燥し、4~5片を巻いて、50 mlの使い捨て用の注射器バレル（スイング遠心ローターに合うように切断されている）の中に入れた。この注射器バレルを50 mlのネジキャップ式の円錐形遠心管に入れ、600 x gにて30分間スイングローター内で遠心処理した。液体を回収し、微小遠心器で10分遠心処理した。上澄を-80℃で保存し、後の実験で使用した。ペプチドの細胞外植物プロテアーゼに対する安定性をテストするために、10  $\mu$ gのペプチド（1 mg/ml）を、pH 7.4の50 mM Tris-HCl緩衝液中で10%の細胞外液と共にインキュベートした。テストしたペプチドは実施例6、13および14に記載の如く調製もしくは入手した。37℃にて、0.15、30、45および60分間インキュベートした後、該プロテアーゼをトリフルオロ酢酸（TFA）を添加して最終濃度1%（v/v）とすることにより不活性化した。ペプチドを、ヒューレットパッカード（Hewlett-Packard）HP1090高圧液体クロマトグラフ（ペンシルバニア州、アボンダールのヒューレットパッカード（Hewlett-Packard）

d)) 上で0.1% TFA中で5~35%アセトニトリル勾配を使用し、3.5ml/minにて、2.1x30mmのPOROS R/Hカラム(マサチューセッツ州、ケンブリッジのパーспекティブバイオシステムズ(PerSpective Biosystems)) 上での逆相クロマトグラフィーにより分析した。ECFとのインキュベーション時間を増大すると、2つの初期溶出ピークが親ピークから生成されることが観測される。表6の結果は親ピークの消失速度を示し、従って淡白分解劣化に対する相対的な耐性を示す。該親のピーク高さの減少速度が遅ければ遅い程、劣化の速度は遅いことを示す。

【表10/】

実施例21: E. コリ中で合成遺伝子を分泌および樹立可能なベプチド遺伝子の構築

分泌可能な合成遺伝子を、普遍的な遺伝子コード、また標的シグナルベプチド配列とは異なる該合成遺伝子の部分に対しては、ゲンバンク(Genbank)(cf. D. M. バッシュ(Bashe) & J. P. マスカレンハス(Mascarenhas), Maize Gen. Coop. Newsletter, 1989, 6, 3, pp. 4-5)における記載から収集したトウモロコシコドン利用表に基づいて設計した。この遺伝子はニンジンエクステンシン遺伝子を含み、これは該細胞外空間に対して該エクステンシンタンパクを標的とし(J. チェン(Chen)およびJ. E. バーナー(Varnier), EMBOJ., 1985, 4, PP. 2145-2151)、NcoI制限エンドヌクレアーゼ認識サイトを含むDNA配列を介してベプチドNo. 12, Met-(SEQ ID No. 20)をコードする配列に結合されている。該NcoI認識サイトの存在はニンジンエクステンシンシグナルベプチドとベプチドNo. 12との間にAla残基を付加する。該Met-(SEQ ID No. 20)をコードする合成AMPPP遺伝子部分は、近接(flancking)の非等価なNcoIおよび植物遺伝子発現調節シグナルを含む任意のプラスミドベクターに有利に装入するのためのPstI認識配列をもつように設計された。該合成AMPPP遺伝子部分は、モデル391PCR-MATE自動化オリゴヌクレオチド合成装置(カリフォルニア州、フォスターシティのアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems))で化学的に合成された2個の合成オリゴヌクレオチドから調製され、(SEQ ID No. 24)および(SEQ ID No. 25)の構造を有していた。これらの遺伝子部分は製造業者等の指示に従って精製した。各精製したオリゴヌクレオチド約500ngを9μl容量の溶液中で混合し、そこに1μlの10Xリンカー/キナーゼ緩衝液を添加した(T. マニアティス(Maniatis)等のMolecular Cloning, p. 396; コールドス

プリングハーバーラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982を参照のこと)。この混合物を15分間80℃に加熱し、次いで200-300mlの水中で徐々に室温まで冷却した。次に、この混合物を更に60分かけて、冷蔵庫にいれることにより4℃まで冷却した。アニール処理した合成AMPPP遺伝子がクローニングされ、かつ正確な配向で付加すべき植物遺伝子発現調節シグナルを含むプラスミドベクターを、該プラスミドDEPGUSO(エニモンアメリカ社(EniMont American Inc.)のJ. コッツィトルト(Cozzitolto)から入手)を制限酵素NcoIおよびPstI(マサチューセッツ州、ベバリーのニューイングランドバイオラボズ(New England Biolabs))で切断することにより調製した。このプラスミドDEPGUSOは広く利用されるプラスミドpUC19(C. ヤニッシュペロン(Yanisch-Peron)等, Gene, 1985, 33, pp. 103-119)にクローニングされた種々のDNAセグメントを含んでいる。これらのDNAインサートは、該pUC19ポリリンカー中のEcoRI制限エンドヌクレアーゼ認識サイトから順にHind III認識サイトまで読むと、DNAの約560塩基対のものであり、該DNAはカリフラワーモザイクウイルス(ストラスブルグ株)からの355の転写開始サイトを包囲し、該サイトは主転写開始サイト、即ちXbaIに近接する合成DNAセグメントおよびNcoI認識サイトに関して+129にあるDdeI認識サイトで終端しており、また該DNAはニンジンのエクステンシン遺伝子の32アミノ酸リダーベプチド配列をコードし(J. チェンおよびJ. E. バーナーの上記文献)、その後には追加Ala残基用のコドン、E. コリβ-グルクロニダーゼ(GUS)(E. C. 3, 2, 1, 31)用のDNAコード配列、約50塩基対のトランスポゾンTn5由来のnptII遺伝子の非機能部分、およびアグロバクテリウムツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)由来のTiプラスミド(H. デグレーベ(De Grove)等, J. of Mol. Appliend Gen., 1982, 1, pp. 499-511)からのT-DNAのオクトバインシンターゼからのポリアデニル化サイトを結合するPvuIIフラグメント由来の約700塩基対のDNAがある。DEPGUSOのNcoIおよびPstI酵素による消化は該GUS遺伝子を遊離し、かつ親ベクターを生じ、該親ベクター内では、植物細胞中に分泌しようとするベプチドまたはタンパク融合生成物として発現すべき適当な読み取り枠内に遺伝子を直接クローニングできる。該プラスミドDEPGUSOは37℃にて90分間、4μgのDNA、8UのNcoI酵素および20UのPstI酵素を含む全体積15μlの

1XKGB緩衝液(M. マックレランド(McClelland)等, Nucleic Acids Res., 1986, 16, p. 364)中で消化され、かつ生成するDNAフラグメントを1X TAE緩衝液の0.8%アガロースゲル上でゲル電気泳動することにより分離した(T. マニアティス等、上記文献、p. 156)。大きなDNAフラグメントをメスで切断し、15 $\mu$ lの蒸留水中に該大きなDNAフラグメントを再分散する前に、ジーン・クリーン(Gene-Clean; Bio101, ラジョラ、カリフォルニア州)で精製した。該大きなDNAフラグメント4 $\mu$ l(即ち、約500ngのDNA)を、1Xリガーゼ緩衝液および600UT4DNAリガーゼ(マサチューセッツ州、ビバリーのニューイングランドバイオラプス(New England Biolabs))を含む全体積25 $\mu$ l中で、アニールした合成AMPPP遺伝子DNA0.05または1.5 $\mu$ lと混合した。これらの混合物を15℃にて一夜インキュベートした。次に、各連結混合物5 $\mu$ lを100 $\mu$ lの受容能のあるE. コリ菌株DH5 $\alpha$ 細胞(メリーランド州、ガイザースブルグのギブコBRL、ライフテクノロジーズ社(GIBCO BRL, Life Technologies Inc.)に添加し、該形質転換混合物をそれぞれ氷上で40分インキュベートした。次いで、この混合物に42℃にて60秒熱ショックを与え、氷上で2分間インキュベートし、次いで500 $\mu$ lのSOC培地(T. マニアティス等、Molecular Cloning(第2版), p. A. 2; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)を添加した後、37℃にて45分間保存した。次に、この形質転換した細胞を素早く遠沈させ、各細胞ペレットを500 $\mu$ lのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、p. A. 1)中に再懸濁した。各形質転換細胞懸濁液の3種の100 $\mu$ l部分を、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する新たなLB寒天プレート上に設置し、該プレートを37℃にて一夜インキュベートした。適当なプラスミド構築体(この構築体をDEPMYP300と呼ぶ)を含有する形質転換したE. コリクローンを、制限酵素地図および50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する5mlのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、pp. 1. 25-1. 28)中で37℃にて一夜育成した各コロニーからミニプレブ(mini-prep)法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。植物発現ベクターDEPMYP300DNAは付随的な変更なしに、形質転換法、例えば標的細胞中に直接形質転換DNAを装入するエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、またはマイクロプロジェクトイル衝撃法などを使用して、植物形質転換に利用できる。分化全能性の胚形成細胞のかかる形質転換は再現性のある植物を与えることができる。上記

の如き直接形質転換法は、容易に形質転換されない作物種、例えば単子葉栽培穀物の培養された胚形成細胞に対して価値がある。

**実施例22: 合成AMPPP Met-([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]マガイニン1)<sub>2</sub>ダイマー遺伝子、該合成遺伝子のE. コリ中での樹立および該合成AMPPP遺伝子の制限発現**

合成AMPPP Met-([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]マガイニン1)<sub>2</sub>ダイマー遺伝子を、普遍的遺伝子コードに基づきおよびグラム陰性バクテリアE. コリ中での制限発現可能な市販品として入手できるバクテリアプラスミドpKK233-2(LKB/ファルマシア社(Pharmacia Inc.)), ニュージャージー州、ヒスカタウェイ)のポリリンカー領域に直接装入するのに有利な近接の非等価なNcoIおよびPstI認識配列をもつように設計した。該合成AMPPPダイマー遺伝子の制御発現は、Met-([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]マガイニン1)<sub>2</sub>の毒性活性のために該宿主細胞の成長に及ぼす有害な影響を防止するために望ましい。この合成遺伝子は、このペプチドの発現を可能とする第一のコドンとしてのATGをE. コリの適当な菌株に導入する。この合成遺伝子部分は、モデル391PCR-MATE自動化オリゴヌクレオチド合成装置(カリフォルニア州、フォスターシティのアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems))上で化学的に合成された構造(SEQ ID No. 26)および(SEQ ID No. 27)を有する2種の合成オリゴヌクレオチドから調製され、また製造業者の指示に従って精製されるであろう。精製した各オリゴヌクレオチド約1~3 $\mu$ gを、1 $\mu$ lの10Xリンカー・キナーゼ緩衝液を添加した9 $\mu$ lの溶液内で混合した(T. マニアティス等、Molecular Cloning, p. 396; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1982)。この混合物を85℃にて15分間加熱し、次いで200-300mlの水中で3時間に渡り徐々に室温まで冷却した。次に、該混合物を冷蔵庫に入れて4℃にて60分間更に冷却した。プラスミドpKK233-2の5 $\mu$ gを、製造業者の指示に従ってもしくは公知の方法で、全体積15 $\mu$ l中で制限酵素NcoIおよびPstI(マサチューセッツ州、ビバリーのニューイングランドバイオラプス)で完全に消化した。T. マニアティス等の上記文献、Molecular Cloning, pp. 98-106参照。次いで、2 $\mu$ lの5M酢酸アンモニウムと70 $\mu$ lの100%エタノール(-20℃)とを水性反応混合物に添加し、該試料を10分間-20℃で保存した後、4℃にて30分間エッペンドルフの小型遠心機で遠心処理した。上澄を捨て、ペレットを真空下で3~5分間乾燥した。次に、この乾燥したペレットを10 $\mu$ lの滅菌蒸留



水に再懸濁し、この全試料を、1X TBE緩衝液(89mMのTris-OH、89mMの硼酸、pH8.3、2.5mMのNa<sub>2</sub>EDTA)中に1μg/mlのエチジウムブロミドを含む0.8%のアガロースゲル中で電気泳動した。全長に渡り線状のpKK233-2プラスミドDNAを長波長UV光の照射下で可視化させ、該線状DNAのバンドをレーザーカミソリで該ゲルから切り出した。精製した線状プラスミドDNAを、製造業者の指示に従って、あるいは同様な方法、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより、ジーン・クリーン(Gene-Clean; カリフォルニア州、ラジョラのBio101)を利用してこの試料から得た。T. マニアティス等の上記文献、Molecular Cloning, pp. 464-467参照。線状pKK233-2プラスミドDNAおよびアニールしたオリゴヌクレオチドは、16μlのDNA水溶液を含む溶液中の少なくとも0.5μgのpKK223-2 DNAを使用して1:3-1:10の範囲の比率で混合される。次いで、2μlの10Xリガーゼ緩衝液(マサチューセッツ州、ピバリーのニューイングランドバイオラプス)および2μlのT4 DNAリガーゼ(マサチューセッツ州、ピバリーのニューイングランドバイオラプス; 400U/μl)を添加した。この連結反応混合物を14~15℃にて一夜インキュベートした。受容性のE. コリ菌株1G109細胞(1. ゴールドバーグ(Goldberg)等の「E. コリ中のコラーゲン類似体-コード合成遺伝子のクローニングおよび発現(Cloning and expression of a collagen-analog-encoding synthetic gene in E. coli)」と題する論文、Gene, 1989, 80, pp. 305-314)を公知の手段で調製した(T. マニアティス等、上記文献、pp. 250参照)。このE. コリ菌株を使用した。というのは、これが菌株の維持中に該合成AMPPP遺伝子との相互遺伝子欠落を最小化するのに役立つ好ましい遺伝的性質を有するからである。該連結反応混合物の2μlを氷上で100μlの受容性細胞と混合し、得られる混合物を氷上で30~60分間放置した。次に、この形質転換混合物を42℃にて60秒間加熱し、氷上で更に2分間冷却し、次に500μlのSOC培地(T. マニアティス等、Molecular Cloning(第2版)、p. A. 2; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)を添加した後、37℃にて45分間保存した。次に、この形質転換した細胞を遠沈させ、各細胞ペレットを500μlのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、p. A. 1)中に再懸濁した。各形質転換細胞懸濁液の3種の100μl部分を、100μg/mlのアムピシリンを含有する新たなLB寒天プレート上に設置し、該プレートを37℃にて一夜インキュベートした。

適当なプラスミド構築体(この構築体をDEPMYP300と呼ぶ)を含有する形質転換したE. コリクローンを、制限酵素地図および50μg/mlのアムピシリンを含有する5mlのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、pp. 1. 25-1. 28)中で37℃にて一夜育成した各コロニーからミニプレブ(mini-prep)法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。該合成[(f)Met-(Arg<sup>r</sup>, Glu<sup>s</sup>, Pro<sup>23</sup>)マガイニン1]<sub>2</sub>遺伝子の制御発現は組み換えバクテリアクローンを30~37℃にて醗酵させ、2~60分間42℃に該培養物の温度を上昇することにより達成される。該培養物の温度を次に37℃にて30~90分間低下して、該細胞を収穫できた。このバクテリア細胞ペーストを次にフレンチプレスに通し、該[(f)Met-(Arg<sup>r</sup>, Glu<sup>s</sup>, Pro<sup>23</sup>)マガイニン1]<sub>2</sub>タンパクを公知の手段により精製できた。例えば、F. M. アンスベル(Ansubel)等編のカレントプロトコールズインMol. Boil. の第16章、ウィリーインターサイエンス、1988を参照のこと。また、[(f)Met-(Arg<sup>r</sup>, Glu<sup>s</sup>, Pro<sup>23</sup>)マガイニン1]<sub>2</sub>に富む該バクテリア細胞ペーストを、植物病原体の感染またはコロニー形成の遅延もしくは排除の目的で、一般に植物組織に直接AMPPP遺伝子生成物またはAMPPPを放出させるために、本発明の範囲内において実施される方法の何れかにおいて利用できる。

実施例23: AMPPP遺伝子含有植物発現カセットの組み換えTiプラスミドへのサブクローニングおよびアグロバクテリウムツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)内での樹立  
オクトバインシンターゼ転写ターミネータによりカラワラワーモザイクウィルス35Sプロモータから該DNA領域を形成するDEPMYP300中に含まれる該植物発現カセットを、多数の双子葉作物種の植物組織を形質転換できるアグロバクテリウムツメファシエンス中の組み換えTiプラスミドを樹立するという最終目的のために、非武装化(disarmed)バイナリーTiプラスミドにサブクローニングした。該植物発現遺伝子カセットDEPMYP300中におけるコドンの利用を、トウモロコシ植物中での発現に対して最適化したが、このカセットにおけるコドン利用は、GCGソフトウェア解析プログラムコドンフリーケンシー(Codon Frequency)(J. デベルー(Devereux)等のNucleic Acids Res., 1984, 12, pp. 387-395を参照)を使用した検索により判断されるように、タバコ等のある種の双子葉植物における発現にも利用できる。約1.3μgのDEPMYP300 DNAを37℃にて2時間27UのBamH1制限酵素(ウイスコンシン州、マジソンのプロメガ社(Promega Corporation))によ



り、1.2  $\mu$ lの10X BamHI緩衝液（ウイコンシン州、マジソンのプロメガ社）を含む全体積12  $\mu$ lの溶液中で消化した。次に、消化したDNAを1X TAE緩衝液（T. マニアティス等、上記文献、p. 156）中の0.8%のアガロースゲル中で電気泳動した。小さなDNAフラグメントをメスで切断し、製造業者の指示に従ってジーン・クリーン（Gene-Clean；カリフォルニア州、ラジョラのBio101）で精製し、次いで蒸留水15  $\mu$ l中に大きなDNAフラグメントを再懸濁した。非武装化したアグロバクテリウムツメファシエンスTiプラスミドpBin19B（D. トロリンジャー（Trollinger）、エニモントアメリカ社（EniMont America Inc.）より入手）の約1.0mgを、DEPMYP300 DNAの消化につき上記した如き条件下で制限酵素BamHIで同時に消化した。Iacポリリンカーの一部の除去を除けば、このプラスミドpBin19BはTiプラスミドpBin19Bと同一であり（M. ベバン（Bevan）、Nucleic Acids Res., 1984, 12, pp. 8711-8721）、該ポリリンカー部分は、それにもかかわらず該ポリリンカーの固有のBamHIおよびEcoRI制限エンドヌクレアーゼ認識配列を残している。該BamHI-切断pBin19Bは、標準的方法（cf. F. M. アンスベル（Ansubel）等編のカレントプロトコールズインMol. Biol. の2. 1. 1章、ジョンウィリー&サンズ、ニューヨーク、NY、1989を参照）によりフェノール抽出され、エタノール沈殿され、その後蒸留水10  $\mu$ l中に再懸濁された。次いで、酵素連結反応を、3U T4 DNAリガーゼ（ウイコンシン州、マジソンのプロメガ社（Promega Corporation）および1Xリガーゼ緩衝液（最終濃度；ウイコンシン州、マジソンのプロメガ社（Promega Corporation））を含む全体積10  $\mu$ lの溶液中で、0.7  $\mu$ lのBamHI-切断pBin19B DNAおよびDEPMYP300のより小さなBamHIフラグメント3.0  $\mu$ lについて実施した。この連結試料を室温にて2時間インキュベートし、次いで2.0  $\mu$ lの該連結混合物を、氷上で、35  $\mu$ lの受容性E. コリ菌株DH5 $\alpha$ に添加した。この形質転換混合物を氷上で45分間維持し、次いで42℃にて60秒間熱ショックを与え、かつ再度氷上で2分間冷却した。後に、500  $\mu$ lのSOC培地（T. マニアティス等、Molecular Cloning（第2版）、p. A. 2；コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY、1989）を添加した後、この混合物を37℃にて45分間保存した。各形質転換細胞懸濁液の3種の100  $\mu$ l部分を、50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含有する新たなLB寒天プレート上に設置し、該プレートを37℃にて一夜インキュベ

ートした。適当なプラスミド構築体（この構築体をDEPMYP300/Bin19Bと呼ぶ）を含有する形質転換したE. コリクローンを、50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含有する5mlのLBブロス（T. マニアティス等、上記文献、pp. 1. 25-1. 28）中で37℃にて一夜育成した各コロニーからミニプレブ（mini-prep）法により単離したプラスミドDNAのDNAの制限酵素地図により同定した。アグロバクテリウムツメファシエンス菌株LBA4404（J. ウィリス（Willis）、エニモントアメリカ社より入手）の培養物5.0mlを、500  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むYEB培地（G. アン（An）等の植物分子生物学マニュアル（Plant Molecular Biology Manual）、クルワーアカデミック社（Kluwer Academic Publishers）、マサチューセッツ州、ボストン、1990を参照）中で一夜育成した。該菌株LBA4404は形質転換T DNAセグメントの欠落するTiプラスミドを含む（A. ヘケマ（Hoekema）等、Nature, 1983, 303, pp. 179-181）。次いで、これらの細胞をYEB培地中で100-倍に濃縮し、DEPMYP3-/Bin19B DNAの1-2  $\mu$ gを氷上で200  $\mu$ lの受容性細胞と混合する。この混合物を液体窒素中で5分間凍結し、次いで37℃に5分間暴露することにより熱ショックを与えた。次に、各形質転換混合物に1.0  $\mu$ lのYEB培地を添加し、かつ該混合物を穏やかに振盪しつつ29℃にて2.5時間インキュベートした。次いで、この細胞を室温にて小型遠心機で30秒間（12,500rpm）遠沈し、500  $\mu$ lのYEB培地に再懸濁し、3種の100  $\mu$ lの各形質転換された細胞懸濁液部分を500  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンおよび50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む新たなYEB寒天プレート上に置いた。これらのプレートを37℃にて一夜インキュベートした。適当なプラスミド構築体を含む形質転換されたA. ツメファシエンスのクローンを、制限酵素地図および500  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンおよび50  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含む5mlのYEBブロス（G. アンの上記文献参照）中で29℃にて一夜育成した個々のコロニーからミニプレブ法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。ここで同定した類の組み換えA. ツメファシエンスのクローンは、植物形質転換の分野で公知の方法により、多数の作物種、主として双子葉植物の形質転換に利用できる。

実施例24：合成AMPPP遺伝子を担持する組み換えTiプラスミドを含むA. ツメファシエンス菌株によるタバコの葉盤（leaf disc）の形質転換

A. ツメファシエンス菌株の担持する組み換えTiプラスミドを使用した外来遺伝子によるタバコの形質転換は双子葉植物に耕種学的に興味のある1または複数のマー

カー遺伝子を伝達するための一般的な方法となっている。非武装化した(即ち、非毒性の)Tiプラスミドを担持するA. ツメファシエンス菌株によるタバコ植物の標準的な形質転換法は詳述されている。そのような有効な方法の一つは、新たに切り取ったタバコ葉盤の形質転換である。該プラスミドDEPMYP300/Bin19Bを担持するものとして実施例23に記載の如く同定されたA. ツメファシエンス菌株LBA4404(A. ヘケマ(Hoekema)等, Nature, 1983, 303, pp. 179-181)の任意の単離体はタバコ葉盤の形質転換に使用でき、該植物発現カセットDEPMYP300を担持するトランスジェニックタバコ植物の樹立に導く。実施例23に記載の如く、この組み換え発現カセット構築体は組み換えTiプラスミドをA. ツメファシエンス菌株LBA4404中に樹立するという最終的な目的のために、該非武装化したバイナリーTiプラスミドpBin19B中でサブクローニングされた。該菌株LBA4404はタバコを包含する多数の双子葉作物種の植物組織の形質転換を可能とする。組み換えプラスミドDEPMYP300/Bin19Bを含むA. ツメファシエンス菌株LBA4404によるタバコ葉盤の形質転換法は、R. B. ホルシュ(Horsch)等の植物分子生物学マニュアル(Plant Molecular Biology Manual)、クルワーアカデミック社(Kluwer Academic Publishers)、マサチューセッツ州、ボストン、1990第5章第A節)におけるp. A5/3の手順4から始まる「葉盤形質転換(Leaf Disc Transformation)」と題する文献に詳細に記載されている。しかし、R. B. ホルシュ(Horsch)等の上記の文献のp. A5/4における随意の工程13および16は、DEPMYP300/Bin19Bにより連続的に形質転換された数種の推定的トランスジェニックタバコ植物を樹立し、かつ該文献の工程16の例におけるように、該植物の存在を少なくとも1種の独立の手段により確認するのに利用される。推定的(putative)トランスジェニックタバコ植物組織中へのT DNAの確認における間接的な生化学的な証拠は、アグロバクテリウムベクターpBin19BのTDNA部分によりコードされるnptII遺伝子精製物の酵素的検出によっても得ることができ、ここではブロット法(B. ライス(Reiss)等, Gene, 1984, 30, pp. 211-218およびA. レイナーツ(Reynaerts)等, 植物分子生物学マニュアル(Plant Molecular Biology Manual)、クルワーアカデミック社(Kluwer Academic Publishers)、マサチューセッツ州、ボストン、1990第9章第A節)のpp. A9/7-8における、選択可能なおよびスクリーニング可能なマーカー(Selectable a

nd Screenable Markers)と題する論文)中で放射性標識されたATPおよび未標識のカナマイシンを使用する。本例で記載した方法により生成した推定的トランスジェニックタバコ植物中の該植物遺伝子発現カセットDEPMYP300によりコードされるAMPPP融合遺伝子生成物の発現は、ノーザンハイブリダイゼーション分析を介してこの植物発現カセットにより形成される特定のメッセンジャーRNA(mRNA)の検出により間接的に確認できる。全RNAは、T. C. バーウォード(Verwoerd)等のRNA単離法(Nucleic Acids Res., 1989, 17, p. 2362)をスケールアップした方法を使用して、タバコ葉盤形質転換開始後4~8週の推定的トランスジェニック植物から集めたタバコの葉の試料の小部分から単離した。簡単に言えば、テストすべき各植物から約10gの葉の組織を洗浄し、細断して50mlのベックマン(Beckman)の遠心機に入れ、液体窒素に入れ、そこで該植物組織を、ホモジナイズ用ドリルバイトまたは場合により該管の底部の形状に一致するブラッシュアダプタを備えた3/8-インチのクラフツマン(CRAFTSMAN)コードレスドリル(イリノイ州、シカゴのシアーズ、ローバック&社(Sears, Roebuck and Co.))を使用して、1~2分間穏やかに粉砕した。約25mlの予備加温した(80℃)抽出緩衝液([0.1MのLiCl, 0.1MのTris-HCl, pH8.0, 0.1MのNa<sub>2</sub>EDTA, 0%のドデシル硫酸ナトリウム]:フェノール=1:1;使用の直前に混合)を各粉砕した組織試料に加え、該試料を30秒間攪拌した。約12mlの24:1クロロホルム:イソアミルアルコールを各管に添加し、該管を再度5~30秒間攪拌した。次に、該管の内容物を、モデルGP遠心機(ベックマンインストルメンツ社(Beckman Instruments Inc.)),バロアルト、カリフォルニア州)で室温にて最高速度で30分間遠心処理し、各管の上部液体相を捨てた。等量の4MLiClと0.03%のジエチルピロカーボネートとを各管に添加(約20~25ml)し、該管を再度5~30秒間攪拌し、次いでこれらを4℃にて一夜放置した。該管を翌日最高速度で、卓上遠心機(ベックマンインストルメンツ社(Beckman Instruments Inc.)),バロアルト、カリフォルニア州)で30分間遠心し、得られた上澄を捨てた。得られたペレットを100%エタノール5~10mlで素早く濯ぎ、最高速度で、卓上遠心機にて5~30分間再度遠心処理した。該エタノール上澄を各試料から除去し、各ペレットを0.1%のジエチルピロカーボネートと5μlのRNアシン(RNasin)阻害剤(ウイスコンシン州、マジソンのプロメガ社(Promega Corporation))とで予備処理した蒸留水5mlに再懸濁した。pH5.5の3M酢酸ナト

リウム約500 $\mu$ lおよび2容の100%エタノール(-20℃)とを各RNA-含有溶液に添加し、全ての試料を氷浴内で1.5-2時間保存した。次いで、該試料を最高速度で、卓上遠心機にて30分間遠心処理して、得られた上澄をすて、各ベレットを素早く100%エタノール(-20℃)1-5mlで濯ぎ、該試料を同一の条件下で再度遠心処理した。該上澄を再度捨て、各ベレットを0.1%のジエチルピロカーボネート予備処理した蒸留水5mlに再懸濁した。各試料の濃度は1:400の希釈率で各試料を蒸留水で希釈したものについて、波長230、240、260、280および320nmにおける分光光度測定により決定した。光学密度比1.3-2.0の範囲の $A_{260}/A_{280}$ 、1.0未満の $A_{260}/A_{280}$ および $A_{230}/A_{260}$ および0.15未満の範囲内の $A_{260}/A_{280}$ は許容できるものとされ、より好ましい値は1.5-2.0の範囲 $A_{260}/A_{280}$ 、1.0未満の $A_{260}/A_{280}$ および $A_{230}/A_{260}$ および0.10未満の範囲内の $A_{260}/A_{280}$ であった。各試料約110 $\mu$ gを、標準的ノーザンハイブリダイゼーションプロット法(c.f. T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版), pp. 7. 37-7. 52; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)により変性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動にかけ、公知の技術(T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版)、上記文献、pp. 7. 49-7. 50)に従って0.22 $\mu$ のナイロン膜(MS1マサチューセッツ州、ウエストボロ)に転写した。実施例21に記載したように全DEPMYP300プラスミドDNAを標準的なニクトランスレーションキット(BRLギブコ(GIBCO)、ライフテクノロジー社(Life Technologies Inc.)メリーランド州、ガイザースブルグ)を使用して、製造業者の指示に従ってニクトランスレーションした。<sup>32</sup>P-標識したプラスミドDNAをセファデックスG-50クロマトグラフィー(T. マニアティス等、Molecular Cloning, p. 464; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1982)により精製した。この放射性標識したプラスミドDNAを、次に標準的な方法(T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版)、p. 7. 52; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)により、ナイロン膜上でRNA試料にハイブリッド化し、次いで該ナイロン膜を1XSSC(c.f. T. マニアティス等、Molecular Cloning, p. 447; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1982)で洗浄および1%のドデシル硫酸ナトリウムを含む0.1

XSSCでの58℃における1時間の追加の洗浄を行った。次いで風乾したナイロン膜を、GBX-2X-線フィルム(イーストマンコダック(Eastman Kodak)、ロチェスター、NY)および1-2枚のクロネックス(Cronex)増強スクリーン(デュポン社(DuPont Corporation)、ウイリントン、DE)と共に1-7日保存し、その後該X-線フィルムを現像した。得られたオートラジオグラムは、真のトランスジェニック植物から採取したこれらのRNA試料に対して、約400塩基のRNA転写を示した。

#### 実施例25: 抗生物ペプチドの相補混合物バイオアッセイ

本発明の範囲内にある抗生物ペプチドの好ましい相補混合物は少なくとも一種の植物病原性真菌に対して比較的活性な少なくとも一種の抗生物ペプチドおよび少なくとも一種の植物病原性バクテリアに対して比較的活性な少なくとも一種の第二の抗生物ペプチドを含む該ペプチドの混合物である。これら2種のペプチドの組み合わせはそれぞれ他のペプチドの各活性を妨害することなく、植物病原性バクテリアおよび植物病原性真菌両者の成長の完全な阻害をもたらす。本実施例では、ペプチドNo. 1(比較的抗真菌性である)とペプチドNo. 4(比較的抗生物性である)とをテストした。これらのペプチドは実施例14に記載の如く調製もしくは入手した。これらペプチドを別々にまたは組み合わせて、実施例16に記載の如く抗真菌性バイオアッセイを実施した。テストすべき各ペプチドの原液はマイクロタイタプレートアッセイウエル内で調製し、かつ以下のような最終濃度とした。

【表11/】各ペプチド原液45 $\mu$ lおよび滅菌した蒸留水45 $\mu$ lを、単独でテストすべきペプチドに対して真菌の胞子を含む単一のウエルに添加した。あらゆる可能な組み合わせでテストすべきペプチドに対しては、選択された濃度の一種のペプチド45 $\mu$ lを、単一のウエル内の第二の選択された濃度のペプチドに添加した。該マイクロタイタプレートパラフィルムで封止し、室温にて48時間インキュベートした。真菌の成長を、4Xおよび/または10X対物レンズを使用して顕微鏡により24および48時間後に観察した。胞子の発芽量および真菌の成長を、以下の如き+および-系を使用して各観察時間において定量的測定値として記録した。[-]は発芽が全く起こらなかったことを示し、[+]は膨らんだ発芽管を有する膨張胞子を意味し、[++]は全体としてルーズな格子の概観をもつ菌糸成長の開始を意味し、[+++]は全体として厚い不透明な網状組織の概観をもつ密な菌糸成長を意味する。次に、各ペプチドに対するMIC値を記録した。このMIC値は胞子発芽の生じない(ランク=-)最低のペプチド濃度として定義される。以下の表7には、各ペプチドに対する胞子発芽の程度を掲載したが、ここでペプチドNo. 1

(この混合物では、比較的抗真菌性のペプチドである)の濃度がそのMCIC値と等しい。表7は、また混合物中の各ペプチドの濃度を同一にして、これらの抗生物質ペプチドを組み合わせた効果を示す。

【表12/】これらのペプチドを別々に、あるいは組み合わせて使用した抗生物質バイオアッセイは実施例17に記載の如く実施した。テストすべき各ペプチド原液約7.5 $\mu$ lおよび7.5 $\mu$ lの水または第二のペプチドの原液を各実験用の同形培養物に対する該マイクロタイタプレート中の単一のウェルに添加した。テストしたペ

プチド希釈物は以下に示す最終ペプチド濃度に対応した。  
【表13/】該マイクロタイタプレートをパラフィルムで封止し、振盪台上で28℃にて44時間までインキュベートした。各EccSR319培養ウェルの光学密度を20および44時間において記録した。次いで、最低完全阻害濃度(MCIC)をペプチドNo. 1およびペプチドNo. 4単独に対して測定した。以下の表8には、各ペプチドに暴露されたバクテリアの該マイクロタイタプレート中の単一のウェル中でのバクテリアの成長の%阻害率を示し、そこではペプチドNo. 4(この混合物中では比較的抗生物性のペプチドである)の濃度がそのMCIC値に等しい。表8は、また混合物中の各ペプチドの濃度を単独の場合と同一にして、これらの抗生物質ペプチドを組み合わせた効果を示す。

【表14/】表7および8にまとめた結果を比較すると、ペプチドNo. 1に対して20 $\mu$ g/mlおよびペプチドNo. 4に対して5 $\mu$ g/mlの濃度がこれら2種のペプチドの相補混合物に要求される要件を満たすことを理解でき、この組み合わせがバクテリアおよび真菌の植物病原体両者の成長を効果的に遅延することがわかる。本発明の原理、好ましい態様および操作の様式を本明細書において記載してきた。しかし、保護さるべき本発明はここに記載の特定の態様に限定しようとするものではない。というのは、これら特定の態様は本発明を限定するのではなく、むしろ例示的なものであるからである。他の者にとっては、本発明の精神並びに範囲を逸脱することなしに種々の変更並びに置換が可能である。

#### 配列リスト

##### (1) 一般的情報

(i) 出願人: マペリ (Mapelli) Ph. D, クラウディオ (Claudio) デロバーティス (DRobertis), キャシー (Cathy) スタール (Stahl), ジェリー (Jerry) スワードロフ (Swerdloff) Ph. D, ミカエル (Michael) D. ウィリアム (William) Ph. D, ジョン (John) I. エベレット (Everett) Ph. D, ニコラス (Nicholas) P.

バスコム (Bascomb) Ph. D, ニューエル (Newell)

(ii) 発明の名称: 特に植物病原体に対する保護用の、逆抗生物ペプチド、抗生物オリゴペプチドおよび他の抗生物組成物、およびその製造並びに使用法

(iii) 配列数: 27

(iv) 通信用住所

(A) 受信人: レーナー (Lerner), デービッド (David), リッテンバーグ (Littenberg), クラムホルツ (Krumholz) & メントリック (Mentlik)

(B) ストリート: 600 サウスアベニュー (South Ave.), ウェストスート (West, Suite) 300

(C) シティ: ウェストフィールド (Westfield)

(D) 州: ニュージャージー (New Jersey)

(E) 国名: アメリカ合衆国

(F) ジップコード (ZIP): 07090

(v) コンピュータ読みだし形式

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピュータ: IBM PC コンバーチブル

(C) 作動システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテンティンリリース (Patent In Release) #1.0, バージョン #1.25

(vi) 現出願日

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(viii) 代理人情報

(A) 名称: テシュナー Esq., ミカエル (Michael) H

(B) 登録番号: 32,862

(C) 書類番号: エニモント (Enimont) 3.0-042

(ix) 通信情報

(A) 電話番号: 908-654-5000

(B) ファックス番号: 908-654-7866

(2) SEQ ID No. 1に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 23 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) 形状: 線状

(ii) 分子の型: ペプチド

(xi) 配列の記載: SEQ ID No. 1  
【化3/】

(2) SEQ ID No. 2に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 23 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 2  
 【化4/】  
 (2) SEQ ID No. 3に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 23アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 3  
 【化5/】  
 (2) SEQ ID No. 4に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 4アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 4  
 【化6/】  
 (2) SEQ ID No. 5に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 5アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 5  
 【化7/】  
 (2) SEQ ID No. 6に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 31アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 6  
 【化8/】  
 (2) SEQ ID No. 7に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 21アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 7  
 【化9/】  
 (2) SEQ ID No. 8に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 37アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: ペプチド  
 (i x) 特徴  
 (A) 名称/キー名: 変性-サイト (Modified-site)  
 (B) 位置: 37  
 (D) 他の情報: 注意=C-末端アミノ酸はアミド形状にある。  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 8  
 【化10/】  
 10 (2) SEQ ID No. 9に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 23アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 9  
 【化11/】  
 (2) SEQ ID No. 10に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 20 (A) 長さ: 23アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 10  
 【化12/】  
 (2) SEQ ID No. 11に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 23アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 30 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 11  
 【化13/】  
 (2) SEQ ID No. 12に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 23アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 40 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 12  
 【化14/】  
 (2) SEQ ID No. 13に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 31アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (i i) 分子の型: ペプチド  
 (x i) 配列の記載: SEQ ID No. 13  
 【化15/】  
 50 (2) SEQ ID No. 14に関する情報:

(i) 配列特性  
 (A) 長さ: 37 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 14  
 【化16/】  
 (2) SEQ ID No. 15に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 21 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 15  
 【化17/】  
 (2) SEQ ID No. 16に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 12 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 16  
 【化18/】  
 (2) SEQ ID No. 17に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 21 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 17  
 【化19/】  
 (2) SEQ ID No. 18に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 6 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 18  
 【化20/】  
 (2) SEQ ID No. 19に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 16 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 19  
 【化21/】  
 (2) SEQ ID No. 20に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 23 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 20  
 【化22/】  
 (2) SEQ ID NO. 21に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 32 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 21  
 【化23/】  
 (2) SEQ ID No. 22に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 28 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 22  
 【化24/】  
 (2) SEQ ID No. 23に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 15 アミノ酸  
 (B) 型: アミノ酸  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: ペプチド  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 23  
 【化25/】  
 (2) SEQ ID No. 24に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 87 塩基対  
 (B) 型: 核酸  
 (C) ストランド型: 一本鎖  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: DNA (ゲノム)  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 24  
 【化26/】  
 (2) SEQ ID No. 25に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 79 塩基対  
 (B) 型: 核酸  
 (C) ストランド型: 一本鎖  
 (D) 形状: 線状  
 (ii) 分子の型: DNA (ゲノム)  
 (xi) 配列の記載: SEQ ID No. 25  
 【化27/】  
 (2) SEQ ID No. 26に関する情報:  
 (i) 配列特性  
 (A) 長さ: 156 塩基対

(B) 型：核酸  
(C) ストランド型：一本鎖  
(D) 形状：線状  
(i i) 分子の型：DNA (ゲノム)  
(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 26  
【化28／】  
(2) SEQ ID No. 27に関する情報：  
(i) 配列特性  
(A) 長さ：148塩基対  
(B) 型：核酸

(C) ストランド型：一本鎖  
(D) 形状：線状  
(i i) 分子の型：DNA (ゲノム)  
(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 27  
【化29／】  
【図面の簡単な説明】  
【図1】好ましいペプチド、ペプチドモノマー、及びブリッジ、ならびにオリゴヌクレオドを含む表であり、その総ては慣用の一文字表記で示されている。



【図1】

<u>SEQ. ID NO.</u>	<u>ペプチド</u>
1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
2	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMNS
3	GIGKXXXXXXXKAFVXXIXXX
4	XXXX
5	XXXXX
6	SWLSKTAKLENSAKKRISEGIATAIQGGPR
7	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL
8	KWKLFKKIEKVQNIRDGIIKAGPAVAVVGGATQIAK-NH <sub>2</sub>
9	SKMIEGVFAKGFKGASHLFGIG
10	SNMIEGVFAKGFKAASHLFGIG
11	XXXIXVFAKXXXXXXKXGIG
12	XXMIEVFAKXFKXAXXLFGIG
13	RPGGQIAIAIGESIRKKASNELKATKSLWS
14	KAIQTAQGVVAVAPGAKIIGDRINQGVKEIKFLKWK
15	LAKLAVKAIKGAIAGAKSAMG
16	RNSLPKVAYATA
17	RQIIIVFMRKKNFVTIKILKKQR
18	AKSRWY
19	IGEDVYTFGISGDSLR
20	GIGKFLREAGKFGKAFVGEIMKP
21	MGRIARGSKMSSLIVSLVVLVSLNLASETTA
22	MKNGSLCCFSLLLLLLLLAGLASGHQVL
23	GGGSGGGSGGGGS

OLIGONUCLEOTIDES

24 CATGGGTATC GGTAAGTTCC TCGCGGAGGC  
 TGGCAAGTTC GGCAAGGCCT TCGTGGCCGA  
 GATCATGAAG CCTTAAGTCG ACCTGCA

25 GGTCGACTTA AGGCTTCATG ATCTCGCCCA  
 CGAAGGCCTT GCCGAAGTTG CCAGCCTCGC  
 GCAGGAAGTT ACCGATACC

26 CATGGGTATC GGTAAGTTCC TCGCGGAGGC  
 TGGCAAGTTC GGCAAGGCCT TCGTGGCCGA  
 GATCATGAAG CCTGGTATCG GTAAGTTCCT  
 GCGCGAGGCT GGCAAGTTG GCAAGGCCTT  
 CGTGGCCGAG ATCATGAAGC CTTAAGTCCA  
 CCTGCA

27 GGTCGACTTA AGGCTTCATG ATCTCGCCCA  
 CGAAGGCCTT GCCGAAGTTG CCAGCCTCGC  
 GCAGGAAGTT ACCGATACCA GGCTTCATGA  
 TCTCGCCGAC GAAGGCCTTG CCGAAGTTG  
 CAGCCTCGCG CAGGAAGTTA CCGATACC

---

フロントページの続き

(72)発明者 キャサリン ダガス デ ロバート  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
 08512クランベリィ ウッド ミル ドラ  
 イヴ 213

(72)発明者 ゲラルディン フランシス スタール  
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
 08629トレントン リンデイル アベニュー  
 1006

(72)発明者 ニューエル フレッド バスコム  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
08648ロウレンスヴィル ガロ コート  
9  
(72)発明者 マイケル デニス スウェドロフ  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
08540プリンストン アルドゲート コー  
ト 14

(72)発明者 ジョン アイラ ウィリアムス  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
08691ロヴィンスヴィル ダーベル ドラ  
イヴ 11  
(72)発明者 ニコラス ボール エバレット  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州  
08534ベニングトン シティ バード ロ  
ード 292 ジェイ

【公報種別】 公開特許公報の訂正  
【部門区分】 第3部門第2区分  
【発行日】 平成16年11月25日(2004.11.25)

【公開番号】 特開平5-294995  
【公開日】 平成5年11月9日(1993.11.9)  
【出願番号】 特願平4-59848  
【訂正要旨】 発明の詳細な説明の誤載により下記のとおり全文を訂正する。  
【国際特許分類第7版】

C 0 7 K 14/00

A 6 1 K 38/00

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 19/00

【F I】

C 0 7 K 14/00 Z N A

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 19/00

A 6 1 K 37/02 A D Z

【記】 別紙のとおり

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-294995

(43) 公開日 平成5年11月9日(1993.11.9)

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/10	C07K 14/00	ZNA
A61K 37/02	C07K 7/08	
C07K 7/08	C07K 19/00	
C07K 15/12	A61K 37/02	ADZ
// C07K 99:00		

審査請求 未請求 請求項の数 60 (全 93 頁)

(21) 出願番号	特願平4-59848	(71) 出願人	591237939
(22) 出願日	平成4年1月31日(1992.1.31)		イスチテュート グイド ドネガニ
(31) 優先権主張番号	07/649784		ソシエタ ベル アチオニ
(32) 優先日	平成3年2月1日(1991.2.1)		イタリア 28100 ノヴァラ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ヴィア ファウセル 4
		(74) 代理人	100059959
			弁理士 中村 悠
		(74) 代理人	100067013
			弁理士 大塚 文昭
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一
		(74) 代理人	100096194
			弁理士 竹内 英人
		(74) 代理人	100074228
			弁理士 今城 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌性反転ペプチド、抗菌性オリゴペプチド及び他の抗菌性組成物、及びそれらの製造法ならびにそれらの使用法

## (57) 【要約】 (修正有)

【目的】 少なくとも一つの微生物病原体特に少なくとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ、抗菌性反転ペプチド (reverse antimicrobial peptides) 組成物を提供する。

【構成】 抗菌性反転ペプチド、抗菌性オリゴペプチド及び他の抗菌性組成物たとえばセクロピンP1を包含する抗菌性ペプチド。微生物病原体からの保護を生物、特に植物に与えるために、これら抗菌性ペプチドを用いる方法。また、抗菌性ペプチドの植物毒性を測定するために有用なスクリーニング方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記モノマーの夫々がN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマーはそのC末端で上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端にペプチド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよいオリゴペプチド。 10

## 【請求項 2】

少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記ペプチドの夫々がN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーはジスルフィド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよいオリゴペプチド。 20

## 【請求項 3】

上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーが結合されているところの末端の少くとも一つにペプチド結合により結合されている少くとも一つの別のペプチドを更に含む請求項 2 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 4】

少くとも一つのペプチドサブユニットを上記ジスルフィド結合から隔てる少くとも一つのブリッジを更に含む請求項 2 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 5】

上記ペプチドモノマーの少くとも一つが、そのN又はC末端以外でCysにより置換されている請求項 2 記載のオリゴペプチド。 30

## 【請求項 6】

上記ペプチドモノマーの少くとも一つがその末端の一つにCysを有する請求項 2 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 7】

少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含む複数のペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドであって、上記ペプチドモノマーの夫々がN末端及びC末端、及び少くとも一つのアミノ酸を含む一つのブリッジを含み、上記少くとも一つのブリッジはN末端及びC末端を含み、上記少くとも一つのブリッジのN末端は上記少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端にペプチド結合により結合され、上記少くとも一つのブリッジのC末端は上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端にペプチド結合により結合され、上記オリゴペプチドは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、上記少くとも一つの第二のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーは少くとも一つの微生物病原体に対して活性であり、かつ上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーは同一であっても異っていてもよく、但し、上記オリゴペプチドがマガイニンPrepro蛋白質の構造を持たないオリゴペプチド。 40

## 【請求項 8】

上記ペプチドサブユニットを上記ブリッジに結合するペプチド結合の少くとも一つを横切るジスルフィド結合、又はブリッジをそれ自体に結合するジスルフィド結合を更に含む請求項 7 記載のオリゴペプチド。 50

## 【請求項 9】

上記少くとも一つのブリッジが約 1 ～ 約 100 のアミノ酸を含む請求項 7 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 10】

上記少くとも一つのブリッジが約 1 ～ 約 20 のアミノ酸を含む請求項 8 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 11】

上記ブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及び Val の群から選ばれる単一アミノ酸である請求項 10 記載のオリゴペプチド。 10

## 【請求項 12】

上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及び Val から選ばれる請求項 11 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 13】

上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及び Val から成る群から選ばれた 2 ～ 5 のアミノ酸を含む請求項 10 記載のオリゴペプチド。 20

## 【請求項 14】

上記少くとも一つのブリッジが、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Lys, His, Pro, Ser, Thr, Tyr, 及び Val から成る群から選ばれたアミノ酸より成る請求項 13 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 15】

上記少くとも一つのブリッジが (SEQ ID No. 5) の構造を持ち、ここで Xaa<sup>1</sup> ～ Xaa<sup>5</sup> は夫々、Gly, Ala, His, Ser, Arg, 及び Pro より成る群から選ばれたアミノ酸である請求項 14 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 16】

Xaa<sup>1</sup> ～ Xaa<sup>5</sup> が夫々 Gly である請求項 15 記載のオリゴペプチド。 30

## 【請求項 17】

上記少くとも一つのブリッジがオメガグループである請求項 7 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 18】

上記少くとも一つのブリッジがトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメインである請求項 7 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 19】

上記少くとも一つのブリッジがベータターンである請求項 7 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 20】

上記ペプチドモノマーの少くとも一つが、植物病原体に対して活性を抗菌性ペプチドである請求項 1、2 又は 7 記載のオリゴペプチド。 40

## 【請求項 21】

約 2 ～ 約 16 のペプチドモノマーを含む請求項 20 記載のオリゴペプチド。

## 【請求項 22】

上記少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーが少くとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドであり、かつ (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、(SEQ ID No. 6)、(SEQ ID No. 7)、(SEQ ID No. 8)、(SEQ ID No. 9)、(SEQ ID No. 10)、(SEQ ID No. 13)、(SEQ ID No. 15)、及び上記ペプチドの単一残基欠如誘導体、上記ペプチドの複数残基欠如誘導体、上記ペプチドの単一残基置換誘導体、上記ペプチドの複数残基置換誘導体、又は上記ペプ 50

チドの単一残基末端付加誘導体より成る群から選ばれた上記ペプチドの機能的誘導体より成る群から選ばれる請求項 2 1 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 3】

C末端アミドを更に含む請求項 2 2 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 4】

上記少くとも一つの第 1 のペプチドモノマー及び上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーの少くとも一つが、(SEQ ID No. 1) 及び (SEQ ID No. 2) より成る群から選ばれた構造を持つペプチドの複数残基置換誘導体であり、かつペプチド構造 (SEQ ID No. 3) [ここで Xaa<sup>5</sup>、Xaa<sup>6</sup>、Xaa<sup>7</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>10</sup>、Xaa<sup>11</sup>、Xaa<sup>12</sup>、Xaa<sup>13</sup>、Xaa<sup>18</sup>、Xaa<sup>19</sup>、Xaa<sup>21</sup>、Xaa<sup>22</sup>、及び Xaa<sup>23</sup> は、互に同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 及び Val から成る群から選ばれる] を有する請求項 2 2 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 5】

Xaa<sup>5</sup> は Phe, Cys, Ile, Leu, Trp 及び Val から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup> は Asn, Ile, Cys, 及び Leu より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>7</sup> は、Phe, Ala, Cys, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Pro, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及び Arg から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup> は Ala, Cys, Met, Pro, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>10</sup> は Gly, Lys, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup> は Met, Cys, Trp, Tyr, Gln, Lys, His, Pro, Ser, 及び Arg から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup> は、Phe, Cys, Ile, Trp, Leu 及び Val から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup> は Leu, Ile, Cys, Trp, Phe, Val, Ala, Gly, 及び Pro から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup> は Thr, Cys, Trp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala, Gly, 及び Pro から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup> は Cys, Ala, Glu, Gln, His, Met, Pro 及び Trp から成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>21</sup> 及び Xaa<sup>23</sup> は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu, 及び Pro より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>22</sup> は Cys, Arg, Asp, His, Glu, Gly, Lys, Gln, Tyr, Trp, Met, Asn, Ala, Pro, ser, 及び Thr より成る群から選ばれたアミノ酸である請求項 2 4 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 6】

植物病原体に対して活性な上記抗菌性ペプチドが、少くとも一つの植物プロテアーゼによる滅成に抵抗性である請求項 2 4 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 7】

Xaa<sup>7</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>21</sup>、Xaa<sup>22</sup> 及び Xaa<sup>23</sup> より選ばれた基の少くとも一つが置換されている請求項 2 6 記載のオリゴペプチド。

【請求項 2 8】

Xaa<sup>7</sup> が Phe, Ala, His, Lys, Glu, Asp, Ser, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup> が Thr, Asp, His, Ser, Ala, 及び Glu より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>21</sup> が Arg, Lys, His, Gln, Trp, Tyr, Thr, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Glu, Asp, 及び Met より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>22</sup> が Ar



g, Lys, Asn, His, Gln, Trp, Tyr, Ser, Thr, Pro, Cys, Ala, Gly, Glu, Asp, 及びMetより或る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>2 3</sup>がSer, Pro, Leu, Cys, Val, Ile及びTrpより成る群から選ばれたアミノ酸である請求項27記載のオリゴペプチド。

【請求項29】

上記少なくとも一つの第一のペプチド及び上記少なくとも一つの第二のペプチドが、(SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、(SEQ ID No. 7)、及び(SEQ ID No. 6)より成る群及びその機能的誘導体から選ばれる請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項30】

10

(SEQ ID No. 3)にペプチド結合された(SEQ ID No. 6)、(SEQ ID No. 6)にペプチド結合された(SEQ ID No. 3)、ブリッジに結合された(SEQ ID No. 6)ペプチド、但しここでブリッジもまた(SEQ ID No. 3)にペプチド結合されている、又はブリッジにペプチド結合された(SEQ ID No. 3)、但しここでブリッジもまた(SEQ ID No. 6)にペプチド結合されている、及びこれらの機能的誘導体より成る群から選ばれた構造を持つ請求項24記載のオリゴペプチド。

【請求項31】

上記オリゴペプチドのN末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項20記載のオリゴペプチド。

20

【請求項32】

上記オリゴペプチドのN末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項22記載のオリゴペプチド。

【請求項33】

(SEQ ID No. 7)のアミノ酸構造を持つペプチド及びその機能的誘導体を含む組成物。

【請求項34】

(SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 9)、(SEQ ID No. 10)、(SEQ ID No. 3)、及び(SEQ ID No. 2)、より成る群から選ばれたアミノ酸構造をペプチドの単一残基置換誘導体を含み、上記ペプチドは単一のCysで置換されているか、又はそのNまたはC末端の一方に付属する単一Cysを有するところの組成物。

30

【請求項35】

少なくとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチドであるペプチドを含む組成物。

【請求項36】

少なくとも一つの微生物病原体に対して活性な上記抗菌性反転ペプチドが、少なくとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である請求項35記載の組成物。

【請求項37】

上記ペプチドが(SEQ ID No. 9)及びその機能的誘導体のアミノ酸構造を持つ請求項36記載の組成物。

40

【請求項38】

上記ペプチドが(SEQ ID No. 10)及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を有する請求項36記載の組成物。

【請求項39】

上記ペプチドが(SEQ ID No. 11)のアミノ酸構造を有し、ここでXaa<sup>1</sup>、Xaa<sup>2</sup>、Xaa<sup>3</sup>、Xaa<sup>5</sup>、Xaa<sup>6</sup>、Xaa<sup>1 1</sup>、Xaa<sup>1 2</sup>、Xaa<sup>1 3</sup>、Xaa<sup>1 4</sup>、Xaa<sup>1 6</sup>、Xaa<sup>1 7</sup>、Xaa<sup>1 8</sup>、及びXaa<sup>1 9</sup>は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びV

50

a 1 より成る群から選ばれる請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 4 0】

上記ペプチドが (SEQ ID No. 11) のアミノ酸構造を持ち、ここで Xaa<sup>1</sup> 及び Xaa<sup>3</sup> は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu, 及び Pro より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup> は Arg, Asp, Cys, His, Glu, Ser, Gly, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro, 及び Thr より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>5</sup> は Ala, Cys, Pro, Gln, Glu, His, Met, 及び Trp より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup> は Thr, Trp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala, Cys, Pro, 及び Gly より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup> は Leu, Ile, Cys, Pro, Trp, Phe, Val, Ala, 及び Gly より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup> は Phe, Ile, Trp, Leu, Cys, 及び Val より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup> は Met, Trp, Tyr, Cys, Gln, Lys, His, Pro, Ser, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup> は Gly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Cys, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup> は Ala, Met, Thr, Pro, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>17</sup> は Phe, Ala, Met, Pro, Cys, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp, 及び Arg より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup> は Asn, Ile, Cys, Pro 及び Leu より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup> は Phe, Cys, Ile, Leu, Trp 及び Val より成る群から選ばれたアミノ酸である請求項 3 9 記載の組成物。

【請求項 4 1】

ペプチド結合により N 末端に結合された単一アミノ酸である単一残基 N 末端付加を更に含む請求項 4 0 記載の組成物。

【請求項 4 2】

上記ペプチドが (SEQ ID No. 12) のアミノ酸配列を有し、ここで Xaa<sup>1</sup> は Ser, Cys 及び Pro より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup> は Cys, Lys, His, Arg 及び Asn より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup> は Cys, Gly 及び Ala より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup> は Cys, Gly 及び Ala より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup> は Cys, Gly, His, Arg 及び Lys より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup> は Cys, Ser, Ala, Glu 及び Thr より成る群から選ばれたアミノ酸であり、そして Xaa<sup>17</sup> は Cys, His, Lys, Arg 及び Phe より成る群から選ばれたアミノ酸である請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 4 3】

上記ペプチドが (SEQ ID No. 13) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 4 4】

上記ペプチドが (SEQ ID No. 14) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 4 5】

上記ペプチドが (SEQ ID No. 15) 及びその機能的誘導体のアミノ酸配列を持つ請求項 3 6 記載の組成物。

【請求項 4 6】

その N 末端に結合されたシグナルペプチドを更に含む請求項 3 4 又は 3 6 ~ 4 5 のいずれ

か1項記載の組成物。

【請求項47】

一つの群の病原体に対して比較的活性であり、他の群の病原体に対して比較的低活性な少くとも一つの第一の抗類性ペプチド、及び上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的の不活性であるところの病原体の群に対して比較的活性であり、かつ上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的活性であるところの病原体の群に対して比較的の不活性である少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドを含む抗菌性組成物。

【請求項48】

上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチド及び上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが植物病原体に対して活性である請求項47記載の抗菌性組成物。

10

【請求項49】

上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが植物病原性バクテリアに対して比較的活性であり、かつ植物病原性真菌に対して比較的の不活性であり、上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが植物病原性真菌に対して比較的活性であり、かつ植物病原性バクテリアに対して比較的の不活性である請求項48記載の抗菌性組成物。

【請求項50】

上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが (SEQ ID No. 6) ; (SEQ ID No. 3) ここで Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Lys、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Ala、Xaa<sup>18</sup> は Ala、Xaa<sup>19</sup> は Ile、Xaa<sup>21</sup> は Met、Xaa<sup>22</sup> は Asn、そして Xaa<sup>23</sup> は Ser である ; (SEQ ID No. 3) ここで Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Lys、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Ala、Xaa<sup>18</sup> は Ala、Xaa<sup>19</sup> は Ile、Xaa<sup>21</sup> は Met、Xaa<sup>22</sup> は Asn、そして Xaa<sup>23</sup> は Ser であり、かつ N 末端 Gly に結合された Met ペプチドを有する ; (SEQ ID No. 2) にペプチド結合された (SEQ ID No. 2) ; (SEQ ID No. 5) にペプチド結合された (SEQ ID No. 2) ; ここで Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> は構造 (SEQ ID No. 2) の他のペプチドに同じく結合されている Gly である ; (SEQ ID No. 3) ここで Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Lys、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Ala、Xaa<sup>18</sup> は Ala、Xaa<sup>19</sup> は Ile、Xaa<sup>21</sup> は Met、Xaa<sup>22</sup> は Asn そして Xaa<sup>23</sup> は Ser であるより成る群から選ばれる請求項49記載の抗菌性組成物。

20

30

【請求項51】

上記少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、N 末端 Gly にペプチド結合された Met を持つ (SEQ ID No. 2)、位置 21 の Met が酸化されている (SEQ ID No. 2)、位置 21 の Met が除去されている (SEQ ID No. 1)、N 末端 Gly が除去され、かつ位置 2 の Ile が Met で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 10 の Lys が His で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 11 の Lys が His で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 10 及び 11 の Lys が夫々 His 及び His で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 8 の Ser が Thr で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 8 の Ser が Ala で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 8 の Ser が Glu で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、位置 7 の His が Phe で置き換えられている (SEQ ID No. 2)、夫々位置 22 及び 23 の Asn 及び Ser が除去されている (SEQ ID No. 2)、位置 10 の Gly が His で置き換えられている (SEQ ID No. 1)、N 末端 Gly が除去されている (SEQ ID No. 2)、N 末端 Gly 及び位置 2 の Ile が除去されている (SEQ ID No. 2)、N 末端 Gly 及び位置 2 の Ile が除去されている (SEQ ID No. 1)、N 末端 Gly が除去

40

50

されている (SEQ ID No. 1)、N末端Glyにペプチド結合されたMetを有する (SEQ ID No. 1)、C末端Serが除去されている (SEQ ID No. 1)、C末端Ser及び位置22のLysが除去されている (SEQ ID No. 1)、位置22のLysがGlyで置き換えられている (SEQ ID No. 2)、C末端Serが除去され、位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する (SEQ ID No. 1)、及び位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、位置23のSerがProで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する (SEQ ID No. 1) より成る群から選択される請求項43記載の抗菌性組成物。

10

【請求項52】

少なくとも一つの微生物病原体に対して活性な少なくとも一つの抗菌性ペプチドを用意する工程、但し、上記抗菌性ペプチドは、少なくとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド、オリゴペプチド、P1、PGL<sup>c</sup>、セクロピンA、上記抗菌性ペプチドの機能的誘導体又はこれらの混合物より成る群から選ばれ、上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドは少なくとも一つの微生物病原体を阻止するのに有効な量で用意されること；及び上記少なくとも一つの微生物病原体を上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドと接触させる工程を含む、微生物病原体を阻止する方法。

【請求項53】

上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドが、少なくとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である請求項52記載の方法。

20

【請求項54】

上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドが、植物組織の少なくとも一表面に局所的施与により与えられる請求項53の方法。

【請求項55】

上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドがトランスジェニック植物における発現により用意される請求項53の方法。

【請求項56】

上記少なくとも一つの抗菌性ペプチドが、トランスジェニック植物における発現、及び引続いで植物細胞間の細胞外空間への輸送により用意される請求項53記載の方法。

30

【請求項57】

抗菌性ペプチドの相対的毒性を測定するために抗菌性ペプチドをスクリーニングする方法において、

少なくとも一つの抗菌性ペプチドと、培養された全体細胞を含む溶液とも混合すること、及び上記培養された全体細胞による酵素消費の変化を測定することの工程を含む方法。

【請求項58】

上記培養された全体細胞が植物細胞である請求項57記載の方法。

【請求項59】

上記植物細胞がプロトプラストである請求項58記載の方法。

【請求項60】

アミノ酸構造 (SEQ ID No. 3) を持つペプチド又はその機能的誘導体を含み、該ペプチドはそのN末端にペプチド結合で結合されたシグナルペプチドを有し、但し上記ペプチドが (SEQ ID No. 1) 又は (SEQ ID No. 2) の構造を持たない組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、病原体に対して活性な、抗菌性反転ペプチド (reverse antimicrobial peptides) を含む或る抗菌性組成物、抗菌性オリゴペプチド、抗菌性ペプチドの混合物を含む混合物、および病原体、特に植物病原体から保護するための該組成物の使用に関する。

50

## 【従来の技術】

たとえば後天性ヒト免疫不全症候群 (AIDS)、及びヒト免疫応答及び病原体防禦系を作用させる又は損う日より見病原体の感染により引き起される関連疾病のような状態を包含する、ヒト免疫応答及び病原体防禦系の構成及び機能について更に発見をなすことに、科学界のかなりの分野が取り組んでいる。この研究の一部として、基礎理論のモデルとして及び潜在的に移植可能性のある因子のソースとして他の生物の免疫は防禦系の生化学に多数の探求がなされてきた。そのような免疫又は防禦因子の一群は、二つの研究者グループ、つまり一つはダットリー・ウィリアムズに指導されたグループ、もう一つはミハエル・ザスロフに指導されたグループによって1987に初めて報告された抗菌性ペプチドである。抗菌性を持つように見えるアフリカツメガエル、*Xenopus laevis*の皮膚内に含まれる腺により分泌される多数のペプチドを、これらグループは成功裡に特徴づけ、報告した。ギオバニニ (Giovannini) ら、「Biosynthesis and Degradation of Peptides Derived from *Xenopus laevis* Prohormones」、バイオケミストリージャーナル (Biochem. J.) 243、(1987)、113-120、及びザスロフ (Zaslaf)、「Magainins, a Class of Anti-Microbial peptidases from *Xenopus* Skin: Isolation, characterization of two active forms and partial cDNA Sequence of a precursor」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84、(1987)、5449-5453、及びテリー (Terry) ら、「The cDNA Sequence Coding for Prepro-PGS (Prepro-Magainins) and Aspects of the Processing of This Prepro-Polypeptide」J. Biol. Chemistry, 263、(1988)、5745-5751を参照されたい。

これらの研究は、少しの術後処置で又は術後処置なしで傷回復の間にかかなりの回復力及び感染しない能力をこのカエルの種が持つという観察によって、少くとも一部促進された。これらペプチドは、集合的にマガイニン (magainins) と呼ばれる。

研究者が気付いているマガイニン及び他のクラスの抗生又は抗菌性ペプチド (たとえばセクロピン (cecropins)、デフェンシン (defensins)、サルコトキシン (sarcotoxins)、メリティン (melittins) など) に関する刊行された研究は、一般にヒト医薬関連健康技術に集中していた。しかしながら、例外としてジェインズ (Jaynes) らの二つの特許出願 (WO 89/04371及びWO 88/00976) が挙げられ、これらは一般に、遺伝的に病気抵抗を高められた植物に関する。ジェインズらは、抗菌性ペプチドのための表現する異種遺伝子を含む遺伝子的に軽質転換された植物が作られると、支持データなしに推定した。この方法で、植物が病気に対する抵抗を高めたと望まれる。しかしジェインズらによれば、約30未満の残基を持つペプチドたとえばメリティン、ボムビニン (bombinin) 及びマガイニンは、作物保護分野での使用には好ましくない。

他の人は、植物における抗菌性ペプチドの存在又は実際に植物病原菌から植物を保護するための抗菌性ペプチドの使用に関する情報を刊行した。EPO O, 299, 828; P. カスチールズ (Casteels) ら、「Apidaecins: Antibacterial Peptides From Honeybees」The EMBO J. 6、(1989)、2387-2391; F. エブラヒム・ネスバット (Ebrahim-Nesbat) ら「Cultivar-Related Differences in the Distribution of Cell-Wall-Bound Thionins in Compatible and Incompatible Interactions Between Barley and Powdery Mildew」Planta 179、(1989)、203-210参照。この研究の殆んどは、基本的に全長の天然抗菌性ペプチドの、植物又は動物における同定及び使用に集

中した。

この研究に加えて、天然に生じるペプチドの多数のバリエーションが調べられた。詳しくは、種々の程度の活性を持つマガイニンに基づく誘導体の多数が作られ、調べられた。ジュレティック (Juretic) ら、Magainin 2 Amide and Analogues, Antimicrobial Activity, Membrane Depolarization and Susceptibility of Proteolysis] *Febs Lett.* 249、(1989)、219-223; チエン (Chen) ら、[Synthetic Magainin Analogues With Improved Antimicrobial Activity] *Febs Lett.* 236、(1988)、462-466; チエン (Chen) ら、米国特許出願No. 280, 363、1988年12月6日出願; クエルボ (Cuervo) ら [Synthesis and Antimicrobial Activity of Magainin Alanine Substitution Analogs] *Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium; Peptides; Chemistry, Structure and Biology* (J. E. リビエル (Rivier) ら)、(1990)、pp. 124-126、ESCOM-Leiden発行、Neth.、クエルボら [The Magainins: Sequence Factors Relevant to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity] *Peptide Research* 1、(1988)、81-86; 国際特許出願No. WO 88/06597; 及び日本国特開平1-299299参照。これらは、マガイニン1及び2の完全単一残基欠落同族体を含み、マガイニン2のN末端欠落、ならびにマガイニン2の完全アラニン (Ala) 置換同族体及び抗菌及び又は抗ガン医薬として有用であるにも知れずかつ第5及び12位で置換されているマガイニン2同族体と選択する。

このような研究のもう一つは、バスコム (Bascomb) らによって行われ、米国特許出願No. 566, 152 (1990年8月10日出願) に報告されている。バスコムらは、活性、少くとも一つの植物プロテアーゼに対する蛋白質分解感受性及び/又は植物毒性のために重要な天然マガイニン上の特定の位置を同定した。バスコムらはまた、戦略的アミノ酸置換及び/又はそれに関する削除を開発した。

上記の努力は、完成とはほど遠い。抗菌性ペプチド構造を機能と関係づける最も単純なモデルについてさえ完全な解明をまだ与えていない。従って、抗菌性ペプチド及びその使用について更に研究する必要がある。更に、天然ペプチド構造のモデルを作ったバスコムらを含む人々によって提供された有望な情報に鑑み、天然に生じるペプチドの種々の変性形の効果の研究は、更なる研究のための有用なモデル及びまた植物及び動物微生物病原体と戦うための有用なペプチドを提供するかも知れない。

本発明は、いくつかの発見に向けられている。第一に、本発明者は、或る新しいペプチド及び、少くとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少くとも一つの植物病原体に対して活性である抗菌性反転ペプチドを包含する、それらの機能性誘導体を同定した。本発明者はまた、先に同定した化合物 (PGLa) の非アミド形 (本明細書ではPGLcと云う) の有用性を発見した。本発明者はまた、抗菌活性を持つオリゴペプチドを発見し、またこれらペプチド及びオリゴペプチドならびにたとえばセクロピン (cecropin) P1 (これはブタ起源であって、こん虫起源でないので、本明細書ではP1と呼ぶ) のようなペプチドが、単独で又は混合物に含有されて、植物病原体に対する保護を与えるのに有用である。これらペプチド又はそれらの機能的誘導体ペプチドは更に、低減された植物毒性、及び/又は蛋白質分解的減成に対する低減された感受性を有する。すなわち、これら化合物及びその或る混合物は、少くとも一つの植物病原体に対する保護を与えるのに有用であり、また実際に、動物及び食品でのより広い用途を持ちうる。

【発明が解決すべき課題】

本発明の目的の一つはく、抗菌性であり、かつ少くとも一つの病原体に対する保護を与え

うる化合物を提供することである。

本発明の他の目的は、少なくとも一つの植物病原体に対して特に活性な抗菌性ペプチドを提供することである。

本発明の更に他の目的は、蛋白質分解に対する低減された感受性及び／又は低減された植物毒性を更に有する、少なくとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドを提供することである。

本発明の別の目的は、生きた細胞の産生物として天然に表現されうる抗菌性ペプチドを提供することである。

これら目的に従い、本発明の一面は、少なくとも一つの微生物病原体特に少なくとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ、抗菌性反転ペプチド (reverse anti-microbial peptides) として知られる新しいクラスの組成物を提供する。そのような組成物は、夫々、RAMP P 及び RAMP P P と名付けられうる。この新しいクラスの組成物は、先に同定された天然マガイニン 1 ペプチド (SEQ ID No. 1) の正確に逆である (SEQ ID No. 9) の構造を持つペプチドを含む。このクラスの組成物の別の一員は、マガイニン 2 (SEQ ID No. 2) と呼ばれる天然ペプチドの同じで、しかし逆の配列である (SEQ ID No. 10) の構造を持つペプチドである。

反転構造の組成物は、1. チャイケン (Chaiken) ら、「Sequence Simplification and Randomization and the Design of Peptide Recognition Surfaces」Peptides: Chemistry and Biology, Proceedings of the 10th American Peptide Symposium, G. R. マーシャル (Marshall) 編、ESCOM, ライデン、オランダ (1988)、354-363に開示されている。これらのペプチドは認識表面を模倣するために用いられた。シャイ (Shai) ら、「Anti-Sense Peptide Recognition of Sense Peptides: Direct Quantitative Characterization With the Ribonuclease S-Peptide System Using Analytical High-Performance Affinity Chromatography」Biochemistry (1987)、26、669-675を参照されたい。また、D-アミノ酸含有エニアチン (抗菌性環状ペプチド) の反転構造が、M. M. シェミアキン (Shemyakin) ら「Topochemical Approach in Studies of the Structure-Activity Relation: Enantio-enantiatin B」Nature, Jan. 28、(1967)、412-413、及び M. M. シェミアキンら「Topochemical Investigations on Peptide Systems」Angew-Chem. Internat. Edit., 8、(1969)、492-499に報告されている。

マガイニン 1 及び 2 がバスコムらにより初めて研究されたとき、これらペプチドは少なくとも一つの植物病原性真菌に対する保護を与えることができ、かつ植物病原性バクテリアに対するある程度の保護を与えることができることが発見された。しかし、これら化合物は、植物、動物、食品などへの添加及び使用に関して重大な疑問を生じるいくつかの望ましくない特性を持つと見い出された。詳しくは、これらペプチドは、植物組織内に含まれる又は動物源から分離される酵素により著しく蛋白分解的滅成を受けることが発見された。また、マガイニン 2 は、比較的高レベルの植物毒性を持つ。従って、植物へのそのような天然ペプチドの添加は、ホスト細胞の死を起しえた。最良でも、これらペプチドは、植物細胞がこれらを消化するので、保護を少ししか又は全く与えない。

これら天然に生じるペプチドの欠点を直す試みにおいて、バスコムら (前出) は、マガイニン 1 及び 2 及び彼らがそれらから誘導した化合物の構造及び機能を広く研究した。変性されたマガイニンペプチドの植物毒性及び／又は蛋白分解的滅成速度を低下し、かつ同時



に少なくとも一つの植物病原体に対する許容できる程度保護を維持するところの変性を同定した。パスコムらはまたこれらペプチドを、植物病原体に対する保護の提供を含む種々の分野により有用となす多数の変性を検討した。

【課題を解決するための手段】

今般、天然に生じる抗菌性ペプチド内に含まれるアミノ酸の配列を、ペプチド結合の方向性を維持しながら、反転することによって、少なくとも一つの微生物病原体及び特に少なくとも一つの微生物性植物病原体に対する許容できる活性及び従って許容できる保護レベルが得られることが見い出された。また本発明者らは、PAMP及び特にRAMPは更に、比較的低い植物毒性及び／又は蛋白分解的減成に対する低い感受性を持つことを見い出した。即ち、これらペプチドは、植物又は動物に植物病原体に対する保護を与えるために植物又は動物に用いる及び／又はそれらに添加するのに適する新規かつ重要なペプチドのクラスを表わす。

見込みある他の反転ペプチドは、(SEQ ID No. 8)のアミノ酸構造を持ちかつC末端アミド形であるセクロピン(Cacropin)Aの反転である(SEQ ID No. 14)のアミノ酸構造を持つ。セクロピン及びその誘導体は、昆虫起源の活性組成物でありかつ、植物及び動物病原体に対して潜在的に有用なものとして同定されてきた。

J. M. ジェインズ(Joynes)ら、「In Vitro Cytocidal Effect of Lytic Peptides on Several Transformed Mammalian Cell Lines」Peptide Res. 2、1989、157-160; J. M. ジェインズら「In Vitro Cytocidal Effect of Novel Lytic Peptides on Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi」FASEB J. 2、1988、2778-83; J. M. ジェインズら「Increasing Bacterial Resistance in Plants Utilizing Antibacterial Genes from Insects」Bioassays 6、(1987)、263-270; J. M. ジェインズら「Method for Introduction of Disease and Pest Resistance into Plants and Novel Genes Incorporated into Plants Which Code Therefor」WO 88/00976、1988年2月11日、米国特許出願889、225、1986年7月25日; J. M. ジェインズら「Plants Genetically Enhanced for Disease Resistance」WO 89/04371、1989年5月18日、米国特許出願115、941、1987年11月2日参照。しかし、本発明者らは、たとえばセクロピンA(SEQ ID No. 8)(C末端アミド形の)は非常に植物毒性であることを発見した。従って、そのアミノ酸配列の反転(SEQ ID No. 14)は、マガイニンに基づくペプチドの構造が反転されたときに見い出されたのと同じ利点を提供するにちがいない。(SEQ ID No. 13)の構造を持つP1及び(SEQ ID No. 15)の構造を持つPGLcの抗菌性反転ペプチド及び同等のペプチドはまた、これら反転ペプチドの総ての機能的誘導体であると考えられる。

本発明は、少なくとも一つの微生物病原体に対する保護を与えるためにこれらペプチドを用いることを包含し、またこれら抗菌性反転ペプチドが標的にされ、たとえば培地又は植物組織中の植物細胞の間の細胞外空間に輸送されるのを可能にするN末端に結合されたシグナルペプチドを含む反転ペプチドを包含する。

上述の目的に従い、本発明の他の面は、(SEQ ID No. 7)の構造を持つ新規な群の化合物及びそれらの非アミド機能的誘導体を提供する。本発明者は、天然に生じるPGLaのアミド不含形(非アミド形はPGLcとして本明細書に示される)が少なくとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少なくとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を有することを見い出した。ウィリアムズ(Williams)ら、「Raman Spectroscopy of Synthetic Antimicrobial Frog

40

10

20

30

40

50

Peptides Magainin 2a and PGLa] Biochemistry, 29, (1990), 4490-4496 参照。

更に別の本発明の一面に従い、本発明者は、そのN又はC末端を置換する又はこれに結合するのではなくて、その構造内で置換された孤立Cysを含む被置換ペプチドの新規なクラスを開発した。これらペプチドは、少なくとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少なくとも一つの微生物性植物病原体に対して活性を有し、本明細書で提供される特定のジスルフィド結合されたオリゴペプチドにおいて用いるのに理想的に適している。

本発明の別の目的は、抗菌性であり、かつ少なくとも一つの病原体に対する保護を与えうる化合物を提供することである。

本発明の別の目的は、少なくとも一つの植物病原体に対して特に活性な抗菌性ペプチドを提供することである。 10

本発明の更に別の目的は、蛋白質分解に対する低減された感受性を更に持つであろう。少なくとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドを提供することである。

本発明の別の目的は、細胞内小室 (subcellular compartments) 及び特に培養細胞又は植物組織中の細胞間の細胞外空間に容易に排せつされうる組成物を提供することである。

本発明の更に別の目的は、比較的長期間細胞間の細胞外空間で活性を保持するであろうペプチドを提供することである。

本発明の別の目的は、複数の異なる抗菌性ペプチドのデリバリーのためのプリカーサーとして用いるペプチドを提供することである。 20

本発明の別の目的は、正常な細胞メカニズムにより容易に表現されるペプチドを提供することである。

されら及び他の目的に従い、本発明の一つの面は、抗菌性オリゴペプチドである新規なクラスの化合物を提供することである。これら新規なペプチドは更に、蛋白分解的減成に対して低い感受性を有しうる。

広い意味において、本発明のオリゴペプチドは、少なくとも一つの第一のペプチドモノマー及び少なくとも一つの第二のペプチドモノマーとして少なくとも二つのペプチドサブユニットを含む機能的蛋白質である。

これら二つのペプチドモノマー、又は個々のオリゴペプチドを成す任意的な追加的ペプチドモノマーは、ペプチド結合により直接に、又はジスルフィド結合又は一以上のブリッジにより間接に相互接続される。レーガン (Regan) 及びW. デグラド (Degrad)、[Characterization of a Helical Protein Designed From First Principles] Science, 241, (1988), 976-978 及びチエン (Cheng) ら、前出 (非抗菌性ペプチドの二量体及び多量体を記載) 参照。また、本発明のオリゴマーは、少なくとも一つのペプチドモノマーをジスルフィド結合に関与するCysから隔てるために一以上のブリッジを用いることにより、又はペプチドユニットをブリッジに結合するペプチド結合の少なくとも一つを横切るジスルフィド結合が形成するのを許すことにより、複数のブリッジ及びジスルフィド結合によって結合されうる。 30

本発明に従い、オリゴペプチドを構成する個々のペプチドモノマーの夫々は一般に、微生物性病原体に対して活性でありかつ、より好ましくは、少なくとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である、自体抗菌性のペプチドである。しかし、任意的なブリッジではなくてペプチドサブユニットの少なくとも二つが少なくとも一つの微生物性病原体及び好ましくは少なくとも一つの微生物性植物病原体に対する活性を持つ限り、ペプチドモノマーの夫々が単独でそのような活性を示す必要はない。得られるオリゴペプチドは自体、少なくとも一つの微生物性病原体に対し、及びより好ましくは少なくとも一つの微生物性植物病原体に対して活性である。従って、二量体 (すなわち二つのペプチドサブユニットのみ) について、用いられた少なくとも一つの第一の及び少なくとも一つの第二のペプチドモノマーの両者及び得られたオリゴペプチドは、少なくとも一つの病原体に対し活性である。本発明の三量体は、少なくとも一つの病原体に対し活性なペプチドサブユニットのみを含む必要はない。た 50

例えば、残り二つのモノマーが少くとも一つの病原体に対して活性であり、かつ得られる三量体も少くとも一つの病原体に対して活性である限り、本発明の三量体オリゴペプチドの末端ペプチドモノマーの一つ又は中間のモノマーが、抗菌性を示さなくてもよい。

本発明のオリゴペプチドは、驚くほど多数の形を取りうる。しかし、簡単のために、本発明のオリゴペプチドは、二量体すなわち介在するブリッジ有り又は無しで二つのペプチドより成るオリゴペプチドとして最良に概念化されうる。これらの最も単純なものは、少くとも一つの第一のペプチドモノマーと少くとも一つの第二のペプチドモノマーから成る、いわゆる頭尾オリゴペプチドである。各ペプチドモノマーは、N末端（アミノ末端）及びC末端（カルボキシル末端）を有し、この両者はペプチド結合を形成しうる。頭尾構造において、少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端アミノ酸は、何らの介在するブリッジ基なしで、ペプチド結合により、少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接結合される。このタイプの頭尾ペプチドの例は、下記構造を持つオリゴペプチドである。(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) ; (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 3) ここでXaa<sup>5</sup>はPhe, Xaa<sup>6</sup>はLeu, Xaa<sup>7</sup>はHis, Xaa<sup>8</sup>はGlu, Xaa<sup>10</sup>はGly, Xaa<sup>11</sup>はLys, Xaa<sup>12</sup>はPhe, Xaa<sup>13</sup>はGly, Xaa<sup>18</sup>はGly, Xaa<sup>19</sup>はGlu, Xaa<sup>21</sup>はMet, Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はProである (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 2) ; (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 14) ; (SEQ ID NO. 13) - (SEQ ID NO. 9) ; (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 10) ; 及び (SEQ ID NO. 6) - (SEQ ID NO. 9)。

上記例の総てにおいて、ハイフンは、ハイフンの左のペプチドモノマーのC末端アミノ酸とハイフンの右のペプチドモノマーのN末端アミノ酸の間の直接ペプチド結合を表す。上記例から容易に判るように、本発明のオリゴペプチドは、夫々が植物病原体に対し活性である同じペプチドモノマー（該ペプチドモノマーの塩基構造は類似し、しかしそれは互に相対的に置換されている）、RAMP PP、及び／又はその構造及び起源が大きく異なるペプチドモノマーから構成されることが出来る。

本発明に従う別のタイプのオリゴペプチドは、いわゆるブリッジされたオリゴペプチドである。一実施態様において、これらオリゴペプチドは、上記のように少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーより成る。しかし、加えて、少くとも一つのアミノ酸から成る少くとも一つのブリッジが備えられる。ブリッジは、N末端及びC末端を持つ。結合されると、本発明のブリッジされたオリゴペプチドは、ブリッジのN末端に直接結合した少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端を有し、そしてブリッジのC末端は少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接結合される。そのようなオリゴペプチドの例として、下記が挙げられる。(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2) ; (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 3) ここでXaa<sup>5</sup>はPhe, Xaa<sup>6</sup>はLeu, Xaa<sup>7</sup>はHis, Xaa<sup>8</sup>はGlu, Xaa<sup>10</sup>はGly, Xaa<sup>11</sup>はLys, Xaa<sup>12</sup>はPhe, Xaa<sup>13</sup>はGly, Xaa<sup>18</sup>はGly, Xaa<sup>19</sup>はGlu, Xaa<sup>21</sup>はMet, Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はProである ; (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2) ; (SEQ ID NO. 9) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 14) ; 及び (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 14)。

上記例の総てにおいてブリッジ内に含まれるアミノ酸の五つ総てがGlyである好ましい五員ブリッジ (SEQ ID NO. 5) が用いられる。他のブリッジ、たとえば長さにおいて好ましくは100以下のアミノ酸又はより好ましくは20以下のアミノ酸のオメガグループ又は他の構造もまた有用である。

本発明の別の面において、ブリッジは、一つという少いアミノ酸を成してもよい。そのような場合のオリゴペプチドの例は、下記の通りである。(SEQ ID NO. 2) - A

NO. 1) を持つ構造により示されることができ、ここでたとえばペプチド (SEQ ID NO. 1) 中の位置  $Xaa^7$  に通常見られる  $His$  はアミノ酸  $Cys$  で置き換えられる。すると、ジスルフィド結合は、二つのペプチドモノマー上の  $Cys$  間で形成される。

上記のいずれも、所望のように結合されることができ、得られるオリゴペプチドはかなりの数の繰返し単位で伸びることができる。たとえば、本発明のオリゴペプチドは、単一アミノ酸 ( $Ala$ ) を持つブリッジにそのC末端  $Ser$  でペプチド結合されている (SEQ ID NO. 2) の構造を持つ第二のペプチドのN末端に直接に、そのC末端でペプチド結合された構造 (SEQ ID NO. 1) を持つことができ、ここで  $Ala$  は (SEQ ID NO. 6) の構造を持つ第三のペプチドのN末端に結合され、この第三のペプチドのC末端は (SEQ ID NO. 12) (ここで  $Xaa^1 = Ser$ ,  $Xaa^2 = Lys$ ,  $Xaa^6 = Gly$ ,  $Xaa^{11} = Ala$ ,  $Xaa^{14} = Gly$ ,  $Xaa^{16} = Glu$ , かつ  $Xaa^{17} = Arg$ ) の構造を持つ第四のペプチドのN末端に直接結合される。得られるペプチドの例は下記の通りである。(SEQ ID NO. 1) = (SEQ ID NO. 2) -  $Ala$  - (SEQ ID NO. 6) - (SEQ ID NO. 12) 10。本発明のオリゴペプチドの別の例は下記の通りである。(SEQ ID NO. 6) - (SEQ ID NO. 1) -  $Gly$  - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 15) - (SEQ ID NO. 14) -  $Cys$  -  $S-S$  - (SEQ ID NO. 3) \*\*, \*。

ここで\*で示されたペプチドモノマーは、この構造における順 (尾尾構成) で左にそのC末端があるように転倒されており、(SEQ ID NO. 3) \*\*の  $Xaa^7$  は  $Cys$  により置換されており、(SEQ ID NO. 3) は  $Xaa^5 = Phe$ ,  $Xaa^6 = Leu$ ,  $Xaa^7 = His$ ,  $Xaa^8 = Glu$ ,  $Xaa^{10} = His$ ,  $Xaa^{11} = Lys$ ,  $Xaa^{12} = Phe$ ,  $Xaa^{13} = Gly$ ,  $Xaa^{18} = Gly$ ,  $Xaa^{19} = Glu$ ,  $Xaa^{21} = Met$ ,  $Xaa^{22} = Lys$ , 及び  $Xaa^{23} = Ser$  を有し、 $-S-S-$  はジスルフィド結合を示す。オリゴペプチドの他の例は、下記である。(SEQ ID NO. 20) -  $Cys-S-S-Cys$  - (SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 2)。ここで (SEQ ID NO. 5) の  $Xaa^1 \sim Xaa^5$  は  $Gly$  である; (SEQ ID NO. 6) - (SEQ ID NO. 7) - (SEQ ID NO. 4) - (SEQ ID NO. 20) -  $Cys-S-S-Cys$  - (SEQ ID NO. 20) \* - (SEQ ID NO. 4) \* - (SEQ ID NO. 7) \* - (SEQ ID NO. 6) \* (ここで (SEQ ID NO. 4) 及び (SEQ ID NO. 4) \* の  $Xaa^1 \sim Xaa^4$  は  $Gly$  である; 及び  $Met$  (SEQ ID NO. 10) -  $Cys-S-S$  - (SEQ ID NO. 2)。ここで (SEQ ID NO. 2) の位置7の  $His$  は  $Arg$  で置換されている。 30

本発明のこの面における別の実施態様において、種々の形のブリッジがジスルフィド結合により結合されて、複合ブリッジ化分子を作ってもよい。得られるオリゴペプチドは、ここで述べたジスルフィド結合されたオリゴペプチドと本質的に同じである。しかし、それらは更に、一以上のペプチドサブユニットをジスルフィド結合から隔てるブリッジを含む 40。このような構造の一例は、(SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) -  $Cys-S-S-Cys$  - (SEQ ID NO. 2) 但し (SEQ ID NO. 5) の  $Xaa^1 \sim Xaa^5$  は  $Gly$  である、の構造を持つオリゴペプチドである。もし得られるオリゴペプチドが頭尾なら、 $Cys$  に結合される (SEQ ID NO. 2) の残基は  $Gly$  である。もし得られるオリゴペプチドが尾尾なら、 $Cys$  に結合される残基は  $Ser$  であり、ジスルフィド結合の左のペプチド構造は (SEQ ID NO. 2) \* と表わされる。このオリゴペプチドにおいて、五つの  $Gly$  残基のブリッジは追加的なスペースを提供し、更なるフレキシビリティ及びモノマー間相互作用を可能にし、同時にジスルフィド結合により種々のモノマーを結合する能力を与える。本発明のより好ましい面において、複合ブリッジは構造 (SEQ ID NO. 5) -  $Cys-S-S-Cys-Ala$  50

一、ここで (SEQ ID NO. 5) の  $Xaa^1 \sim Xaa^5$  は Gly である、を持つ。この構造は、ジスルフィド結合により隔てられた二つのブリッジを含む複合ブリッジを用いる。

別の態様において、ブリッジとジスルフィド結合の組合せは、独特なオリゴペプチドを与えるために用いられうる。本発明のこの面において、ここで記載するようなブリッジされたオリゴペプチドは、二つのペプチドモノマーか又は一つのペプチドモノマーと一つのブリッジを含み、これらは単一 Cys により置換されており、あるいはブリッジは二つの Cys を含む。ジスルフィド結合は、ジスルフィド結合がまた、Cys 含有モノマーをブリッジに結合する又は全体的にブリッジ内にあるペプチド結合の一つを横切るように、Cys アミノ酸間に形成されてよい。

10

そのような得られるオリゴペプチドの一つはたとえば、構造 (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 4) - (SEQ ID NO. 2) を持ち、ここで構造 (SEQ ID NO. 1) を持つペプチドの位置 21 に通常見られるアミノ酸 Met は Cys で置換されており、(SEQ ID NO. 4) 中で  $Xaa^1$  は Gly、 $Xaa^2$  は Cys、 $Xaa^3$  は Gly、 $Xaa^4$  は Gly であり、ジスルフィド結合は二つの Cys アミノ酸の間に形成される。同様に、得られるオリゴペプチドの例は、(SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 4) - (SEQ ID NO. 2) の構造を持ち、ここで構造 (SEQ ID NO. 1) を持つペプチドの位置 21 に通常見られるアミノ酸 Met は Cys で置換されており、(SEQ ID NO. 4) 中で  $Xaa^1 \sim Xaa^4$  は Gly であり、(SEQ ID NO. 2) の構造を持つペプチドの位置 2 に通常見られるアミノ酸 Ile は Cys で置換されており、ジスルフィド結合は二つの Cys アミノ酸の間に形成される。オリゴペプチドの別の例は、構造 (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 15) - (SEQ ID NO. 2) を持ち、ここで (SEQ ID NO. 4) について  $Xaa^1$  は Cys、 $Xaa^2$  は Gly、 $Xaa^3$  は Pro、 $Xaa^4$  は Cys であり、ジスルフィド結合はブリッジ内の二つの Cys 間に形成される。Mutter (Mutter), 「The Construction of New Proteins and Enzymes - A Prospect for the Future?」Argew. Chem. Int. Ed. Engl., 24, (1985), 639-653 参照。

20

本発明の別の面に従い、その N 末端にシグナルペプチドを付着させたオリゴペプチドが提供され、これはそれによって、本明細書記載のオリゴペプチドをオリゴペプチド産生のリボソーム部位から細胞間の細胞外空間へと輸送するのを促進し、従って得られるオリゴペプチドは少なくとも一つの微生物病原体による侵入に対する保護を与えるのにより有効でありうる。

30

本発明はまた、病原性微生物の攻撃、移転増殖又は感染の悪影響から生物及び好ましくは植物を保護するために、本明細書記載のオリゴペプチドを用いる技術を含む。

本発明の別の目的は、植物病原体を含む病原体に対する高められた活性を持つ化合物を提供することである。

本発明の他の目的は、組成物の一成分により提供されうるよりも広い範囲の可能性ある微生物保護を示す組成物を提供することである。

40

本発明のこの面において、二以上の別個の抗菌性ペプチドの混合物を含む新規化合物が提供される。このような抗菌性組成物の一つは、一つの群の病原体に対して比較的活性であり、他の群の病原体に対して比較的の不活性な少なくとも一つの第一の抗菌性ペプチド、及び上記少なくとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的の不活性であるところの病原体の群に対して比較的活性であり、かつ上記少なくとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的活性であるところの病原体の群に対して比較的の不活性である少なくとも一つの第二の抗菌性ペプチドを含む。

本発明者は、特定の抗菌活性、蛋白分解的減成及び／又はペプチドの植物毒性の低減を与えるために、上記のバスキムらの適用に従ってマガイニン 1 及び 2 を変性 (修飾) するにおいて、マガイニンに構造的に関係するペプチドの活性に或る犠牲が時に生じることを発

50

見した。すなわち、たとえば、得られたペプチドは、低減された植物毒性又は蛋白分解的減成に対する高められた抵抗、又はこの両者を持つことができ、かつ特定の病原体又は特定のクラスの病原体に対してなおも活性でありうる。しかし、しばしば、これら改良されたペプチドは、他の病原体に対する実質的な活性を失う。たとえば、本発明者は、位置8のSerをGlnで置換することによって(SEQ ID NO. 2)の構造を持つマガイニン2を修飾することにより、得られたペプチドは植物毒性における実質的低減及び蛋白分解程度における実質的低減を有する。P3フサリウム(*Fusarium*)のような植物病原性真菌の生長を禁示するのに必要な最小完全阻止濃度は、 $20 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ から $40 \mu\text{g/ml}$ へ高められる。

しかし、エルウィニア カルトボラ カルトボラ(*Erwinia Carotovora carotovora*)のような植物病原性バクテリアに対する保護を与えるのに必要な組成物の最小完全阻止濃度は約 $40 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ から $150 \mu\text{g/ml}$ 超へと増大する。明らかに、この組成物は、その低減された植物毒性及び蛋白分解感受性の故に、大きな見込みがある。しかし、その使用は、他の植物病原体の顕著なクラス(すなわちバクテリア性病原体)に対するその不活性により幾分損なわれる。

本発明者は、他のペプチドが、植物病原体に関し、対応するしかし相補的挙動を示すことを発見した。たとえば、上記のマガイニン2誘導体と違ってP1(SEQ ID NO. 6)はエルウィニア カルトボラ カルトボラに対して非常に活性であり、しかしP3フサリウムに対して比較的不活性であることを、本発明者は見出した。そのような相補的ペプチドの二以上の混合物は、一つの抗菌性ペプチド単独の使用により実現できない広いスペクトルの保護を与えることができる。さらに、これらペプチドは植物細胞ホストの生育性を阻害せず、かつ少なくとも一つの植物プロテアーゼの存在下で不必要に短いライフスパンの欠点を有さない。これら化合物は、植物病原性真菌及びバクテリアに対する広いスペクトルの活性を持ち、同時に低減された植物毒性及び蛋白分解に対する増大された総体的抵抗を持つ混合物として提供されうる。これら混合物は、二以上の抗菌性ペプチドを作り、集めそして混合することにより、及び／又は形質転換されたホスト細胞中でこれらペプチドを同時表現するように一又は複数の遺伝子进行操作することにより提供されうる。また、これらペプチドは、本明細書記載のようにリンクされてオリゴペプチドを形成し、次にたとえば植物内に含まれる蛋白分解酵素により開裂されることができる。これは、二つの相補的抗菌性ペプチドの混合物のインサイツ形成を結果する。

本発明の他の目的は、抗菌性ペプチドの相対的毒性を測定するために抗菌性ペプチドを簡便にスクリーニングする方法を提供することである。

本発明の一面に従い、少なくとも一つの抗菌性ペプチドと、培養された全体細胞を含む溶液とも混合すること、及び上記培養された全体細胞による酸素消費の変化を測定することの工程を含む、相対的毒性を測定するために、抗菌性ペプチドをスクリーニングする方法が提供される。培養された全体細胞により消費される酸素の抑制の程度は、培養された細胞と一般の細胞の両者に対する、ペプチドの相対的毒性の指標である。

このスクリーニング法に従う好ましい実施態様において、培養された全体植物細胞が用いられる。本発明の別の好ましい実施態様において、植物細胞はプロトプラストである。

本発明の好ましい実施態様を以下で説明する。

本発明に従い用いられる種々のペプチドは、少なくとも一つの微生物病原体に対して活性な抗菌性ペプチドである。しかし、本発明の好ましいペプチドは、AMP PPという言葉で表わされ、これはAntimicrobial Peptide Active Against Plant Pathogenの略であり、本明細書で定義する如く、植物病原体に対する少なくとも抗真菌及び／又は抗バクテリア活性を持つ蛋白質又はペプチドである。

本発明の目的のために好ましいこれら抗菌性ペプチド及び特にAMP PP組成物は、多数の基準の少なくともいくつかを満たすようなものである。本発明に従うペプチド及びオリゴペプチドのための主な基準は、一以上の病原体及び特に植物病原体に対する活性である。即ち、これらペプチドは、好ましくは、植物病原体の生長を阻止しかつ／又は植物病原体の

生存を制限するにおいて有効である。植物病原体という言葉は、植物に損傷及び／又は病気を起すことができる生物を包含し、真菌、原核生物（バクテリア及びマイコプラズマ）、ウイルス及びウイロイド、線虫、原生動物などを含む。

たとえば、植物の病気を起しうる8000種以上の真菌がある。Plant Pathology, 第3版、George N. Agrios, Academic Press, Inc., 1988; A Literature Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, A. Y. Rossmanら、American Pathological Society, St. Paul, MN, 1988; The Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, N. W. Schaad, American Phytopathological Society, St. Paul MN, 1980参照。そのような病原体の広汎な  
10  
列挙に照し、本発明の文脈において最も有用なAMP PPは、多数の植物病原体の生長又は生存を禁止する又は阻げる広いスペクトルの活性を持つ、又は特定の群の病原体、特に多くの作物に病気を起す群に対して極めて有効であるものである。たとえば、エルウィニア種は、1年に数10億ドルを農家に支出させる種々の腐敗病及びしおれ病に対して責任がある。従って、エルウィニア種の生存又は増殖を抑制できる一以上のAMP PPが望まれる。しかし、特定の種の真菌に対し及び／又は特定のホストを攻撃するのに加わるかも知れない他のクラスの病原体に対しある程度の活性をも備えるAMP PPがより望ましい。  
20  
そのような状況の例はメイズにおける茎腐敗病であり、これはいくつかの種の真菌及びバクテリア（たとえばFusarium種、Gibberella種、Diplodia種、Macrophomina種、Pythium種、Cephalosporium種、Erwinia種、Pseudomonas種）の種々の組合せにより起される。他の例は、損傷した組織が植物生産物の収穫後の病気におけるように、腐生生物により侵入された状況である。

多数の芝生の又は良性の微生物（それは主にバクテリア種である）が植物に関連して見られる。有用なAMP PPは、これら微生物の生存に影響を有さず、一以上の区別される植物病原体の有効的抑制を示すものである。従って、ある状況において、ある程度の特異性が有利である。たとえば、根系の保護が望まれるとき、空气中窒素を固定するリゾビウム種のような生物又は根を或る病原体から保護するよう働くシュドモナス種のような根生  
30  
生物を無傷のままに残すことが有利である。これら有益な又は良性の生物の多くはバクテリアであるので、バクテリアに対して低減された活性を持つAMP PPに特定の有用性がある。

この言葉は抗菌性ペプチドの一以上の全類に広く適用されうるが、少なくとも一つの病原体に対し活性な抗菌性ペプチド及び言葉「AMP PP」は下記を包含する：マガイニン1；マガイニン2；反転マガイニン；P1及び反転P1、PGL<sup>d</sup>及び反転PGL<sup>e</sup>；セクロピン（Cecropin）A、B及びDを含むセクロピン及びそれらの反転ペプチド、H. G. ボーマン（Boman）ら、「On the Primary Structures of Lysozymes, cecropins, and Attacins from Hyalophora ceropia」Developmental and Comparative Immunology, 9, (1985), 551-558参照；サルコトキシン（Sarcotoxin）及びその反転ペプチド；ボンビニン（Bombinin）及びその反転ペプチド、A. クソーダス（Csordas）及びH. ミクル（Michl）、「Isolierung und Strukturaufklärung eines Hamolytisch wirkenden Polypeptides aus dem Abwehsekret europäischer Unken」Monat. für Chemie, 101 (1970), 182-189参照；XPF及びその反転ペプチド；チオニン（Thionin）及びその反転ペプチド；デフェンシン（Defensin）及びその反転ペプチド、H. ボーゲル（Vogel）ら、「The Structure of Melittin in Membrane  
40  
50



nes] Biophys. J., 50, (1986), 573-582 参照; メリチン (Melittin) 及びその反転ペプチド、H. ボーゲルら、「The Structure of Melittin in Membranes」Biophys. J., 50, (1986), 573-582 参照; 及び他の同等のペプチド及びその機能性誘導体。

本明細書で機能的誘導体という言葉は、単一残基欠如誘導体、複数残基欠如誘導体、単一残基置換誘導体、複数残基置換誘導体、単一残基末端付加誘導体、及びペプチドのC末端アミドを包含する。

単一残基欠如誘導体という言葉は、特定に述べられたペプチドの残基の一つが欠如している他はそれと同じである又はこれに関係づけられる構造を持つ特定のペプチドを意味する 10  
。たとえば、[DES Met 21] MAG1は、その構造が (SEQ ID No. 1) により示されるマガイニン1の構造と同じペプチドであるが、N末端Glyに対し21番目の位置に通常見られるMetが除去されている。(Desという表示は除去を示し、Metは除去されたアミノ酸を示し、21は除去されたMetが天然に生じるペプチドで占める位置を示し、MAG1はそうように変性されたペプチド (マガイニン1) を示す。) 得られる22のアミノ酸のペプチドは、ここで定義したように単一残基欠如誘導体である。同様に、複数残基欠如誘導体とは、さもなくば同一である又は関連づけられるところの配列から一より多いアミノ酸が除去されているペプチドを云う。たとえば (DES (Lys 22, Ser 23) ] MAG1は、(SEQ ID No. 1) により示されるマガイニン1と構造が同じペプチドであるが、位置23のC末端Ser及び位置22 20  
にある隣りのアミノ酸Lysが共に除去されている。得られる21のアミノ酸のペプチドは、本発明に従い複数残基欠如誘導体であり、より詳しくは二残基欠如誘導体である。本発明に従う単一残基置換誘導体とは、一つの残基が変えられていることを除いては同一である又は関連づけられる化合物の構造に同じであるペプチドを包含する。たとえば「Gln 8] MAG2は、(SEQ ID No. 2) により示されるマガイニン2と同じペプチドであるが、マガイニン2の位置8に通常見られるSerがGlnで置き換えられ、つまり置換されている。得られた23のアミノ酸のペプチドは、本発明に従い単一残基置換誘導体である。本発明に従う単一残基置換誘導体という言葉はまた、一つのCysアミノ酸で内部的に (すなわち末端ではなく、又はそれに付着されるのではなく) 置換されたペプチドの群を包含する。そのような化合物の例は、[Cys 22] Mag2、[C 30  
ys 8] Mag1、[Cys 8] Mag2などである。

同様に、本発明に従う複数残基置換誘導体とは、複数の置換がなされていることを除いては、特定の又は関連づけられるペプチドと同一のペプチドを云う。たとえば [Ala 13, 18] MAG1は、(SEQ ID No. 1) で示されるマガイニン1と同一のペプチドであるが、マガイニン1の位置13及び18に通常見られるGlyがAlaで置き換えられている。同様に、[Arg 7, Gln 8, Pro 23] MAG1 (SEQ ID No. 20) は、位置7のHisがArgで置き換えられ、つまり置換され、位置8のSerがGlnで置き換えられ、位置23のSerがProで置換されていることを除き、マガイニン1に同一のペプチドである。得られたペプチドは、複数残基置換誘導体である。このタイプの他のペプチドは [Arg 7, Cys 8] MAG1である 40  
。これら誘導体は、排他的な変性ではない。すなわち、ペプチドは、置換及び欠如の両者の誘導体であることができる。たとえば [Des Gly 1, Met 2] MAG2は、(SEQ ID No. 2) を持つマガイニン2と同じ構造のペプチドであるが、N末端Glyが除去されており、かつN末端に対し位置2に通常見られるIleがアミノ酸Metで置き換えられ、つまり置換されている。得られるペプチドは、本発明に従い単一残基欠如誘導体であり、かつ単一残基置換誘導体である。

何らかの特定の欠如又は置換に限定されるものではないが、マガイニンに構造的に類似するペプチドのためのより好ましい置換のいくつかは、(SEQ ID No. 3) の構造を持つペプチドにより示される。この配列で用いられる「Xaa」は、可変物を示し、そこにアミノ酸の選択された群のいずれかが位置されうる。従って「Xaa<sup>n</sup>」は、可変物 50

を示すのに用いられるのみでなく、その可変物の相対的位置又はその可変物が示すアミノ酸を表すためにも用いられる（すなわち  $n$  は、位置又は第  $n$  番の位置のアミノ酸を表す）。従って、 $Xaa^6$  は、(SEQ ID No. 3) の構造を持つ AMPPP の第 6 番の位置の可変物を示す。第  $n$  番の位置は、ペプチドの N 末端（これらペプチドについては通常グリシン (Gly) である）に対する。上記のペプチドが (SEQ ID No. 3) の構造を持つペプチドの N 末端アミノ酸（通常 Gly）にペプチド結合により付着された単一残基 N 末端付加たとえばメチオニン (Met) 又は N-ホルミル化 Met 「(f) Met」, Cys, His 又は Ser を含むときに、可変物  $Xaa^6$  はその表記及び N 末端に対する位置を保持する。これは、絶対的な意味において今や第 6 番の位置は得られたペプチドにおける第 7 番残基である事実には拘らずである。同様に、もし N 末端 Gly が欠如して、たとえば可変物  $Xaa^6$  が得られたペプチドで第 5 番残基であるなら、しかしこの可変物は  $Xaa^6$  という表記のままである（すなわち Ile Gly Lys Phe  $Xaa$  について  $Xaa$  はなお  $Xaa^6$  である）。そのような言葉で表わすと、マガイニン 1 はあるいは、(SEQ ID No. 3) （ここで  $Xaa^5$  は Phe,  $Xaa^6$  は Leu,  $Xaa^7$  は His,  $Xaa^8$  は Ser,  $Xaa^{10}$  は Gly,  $Xaa^{11}$  は Lys,  $Xaa^{12}$  は Phe,  $Xaa^{13}$  及び  $Xaa^{18}$  は Gly,  $Xaa^{19}$  は Glu,  $Xaa^{21}$  は Met,  $Xaa^{22}$  は Lys, そして  $Xaa^{23}$  は Ser である）の構造を持つペプチドとして表わすことができる。マガイニン 2 は、 $Xaa^{10}$  が Lys であり、 $Xaa^{22}$  が Asn である点を除き、マガイニン 1 と構造的に類似である。

図 1 において、本発明に従う好ましいペプチドのいくつかが一文字表現で示されている。この表現で用いられる「X」は可変物であり、上記の  $Xaa$  と同じである。すなわち、図 1 の第 3 行 (G I G K X ……) における第 5 番の文字は  $Xaa^5$  に等しく、 $Xaa^5$  と同じくアミノ酸で置き換えられうる。第 8 行の C 末端の「NH<sub>2</sub>」は、そこで示されるペプチドの C 末端アミド形を示す。

そのような修飾の利点の一つは、病原体に対して改善された活性を示す抗菌性ペプチド及び特に AMPPP の製造でありうる。

本発明に従う好ましいペプチド組成物を選択するため及び、実際に特定の変性を選択するの別の基準は、一以上のプロテアーゼ及び特に一以上の植物プロテアーゼ又は植物病原体プロテアーゼによる消化即ち減成に対する抵抗である。植物は、細胞内、細胞内小器官内、小室内、又は細胞間の細胞外空間内に、蛋白質を減成するのに用いられる酵素を含む。これら酵素（プロテアーゼとしても知られている）は、アミノ酸配列を結合している特定の結合を切り、不活性な又は低活性なフラグメントを作ることにより、蛋白質又はペプチドを減成する。植物病原体もまた、多くの場合、抗菌性蛋白質又はペプチドを減成しそしてたぶん不活性にすることができるプロテアーゼを作り分泌する。本発明の文脈において、この自然現象は、さもなければ植物病原体を阻止することによって植物を保護するであろう AMPPP を失活させるるので、不都合である。この問題は、細胞外空間に含まれるプロテアーゼに曝される典型的に適用される AMPPP 及び細胞内には細胞外プロテアーゼに曝される表現された AMPPP の両者に生じる。

天然のマガイニンにおける  $Xaa^{10}$  -  $Xaa^{11}$  位置の翻訳後開裂は、アフリカツメガエルの皮膚の浸出物に特有のプロテアーゼにより自然に引き起こされ、これはこの部位が消化のためにプロテアーゼにとって利用しうることを示している。M. G. ギオバニニら（前出）参照。

一以上の植物プロテアーゼに感受性であると特性づけられうるペプチド結合に隣接する部位における少くともいくつかのアミノ酸置換及び／又は欠如は、蛋白質分解を低減する又は除去するにちがいない。これは、プロテアーゼ酵素と AMPPP 基質開裂部位の間の乏しい適合性の誘発による個々の植物プロテアーゼの作用の抑制に少くとも部分的に起因するであろう。

植物プロテアーゼを含む植物細胞外液による AMPPP の処理による植物蛋白分解的減成は、マガイニン 1 及びマガイニン 2 の夫々位置 7 及び 8 の His と Ser の間、及び夫々マガイニン 2 及び 1 の位置 21 及び 22 の Met と Asn 又は Met と Lys の間の結合

10

20

30

40

50

の開裂により起ることが、予期されず見い出された。これら現象の認識において、植物プロテアーゼによる不都合な蛋白分解的減成を大きく低減するのに有効な特定の置換が、これら位置の一以上で見い出された。従って、そのように修飾されたペプチドは、突然変異植物における表現のための可能性ある候補であり、また作物保護のための慣用の適用のために有用でありうる。植物及び／又は植物病原体プロテアーゼによる不都合な蛋白分解的減成を低減する（除去しないとしても）のに有効でありうる上記位置での置換は、下記を包含する。Xaa<sup>7</sup>におけるPhe, Ala, Glu, Asp, Lys, Ser, 又はArg, Xaa<sup>11</sup>におけるThr, Asp, Ala, His, 又はGlu, Xaa<sup>21</sup>におけるArg, Lys, His, Gln, Trp, Tyr, Thr, Val, Ala, Leu, Ile, Glu, Asp, 又はPhe, Xaa<sup>22</sup>におけるArg, His, Glu, Trp, Tyr, Thr, Ala, Cys, Lys, Gly, Asp, Asn, Pro 又はMet, Xaa<sup>23</sup>におけるPro, Leu, Cys, Val, Ile, 又はTrp。

10

本発明のこの面におけるより好ましい置換は、Xaa<sup>7</sup>におけるArg又はLys置換、Xaa<sup>8</sup>におけるGln置換及び／又はXaa<sup>23</sup>におけるProである。

AMP PPにおける位置7、8、21又は22及び／又は23における好ましいアミノ酸置換のいずれか又は全部は、本発明に従う他の置換、欠如及び／又は延長と組み合わせることができ、蛋白分解に抵抗性であるのみでなく、一以上の植物病原体に対する増大された活性、特定の植物病原体に対する選択された活性及び／又は低い植物毒性を持つペプチドを提供する。

20

本明細書で、単一残基末端付加誘導体とはたとえば、C又はN末端に一つの追加的残基がペプチド結合により加えられたところの、(SEQ ID No. 1)の構造を持つマガイニン1のようなペプチドを云う。そのような単一残基末端付加誘導体の例は、マガイニン1分子のN末端にアミノ酸Metがペプチド結合されている[Met]MAG1、マガイニン1のN末端にホルミル化Metがペプチド結合されている[(f)Met]MAG1、及びマガイニン1のC末端SerにCysがペプチド結合されている[Cys 24]MAG1である。この言葉はまた、他の末端付加、たとえばN又はC末端に付着されたHis又はSerの使用をも包含する。

上記のように、本発明で用いられるべき好ましい組成物を選択するための更に別の基準は、比較的低い細胞毒性及び植物においては植物毒性である。本発明の抗菌性ペプチドは、その宿主細胞に対し、又は該ペプチドが適用される組織に対し比較的低い毒性を持たねばならない。AMP PPは好ましくは、植物細胞又は植物組織に対して相対的に最小の毒性挙動を示す。特に、抗菌性を増すよう又は蛋白分解的減成への抵抗を増すデザインされた修飾は、植物毒性を実質的に増大してはならない。毒性挙動は、死、生長低下、空气中炭素の光固定の低下、栄養たとえば窒素又はリンの同化の低下、又は作物収量の低下により現わされる。従って、宿主と機能的に相容性であるペプチドを提供することが重要である。

30

従って、一つのAMP PPを、他のAMP PPと、又は天然のマガイニン又は他の天然の抗生ペプチド又は工業的価値が実際にある又は見込める他の天然又は合成の抗生化合物と比較するにおいて、植物毒性のいくつかの相対的指標が好まれる。そのような一つの指標は、正常な植物細胞小器官機能の抑制におけるAMP PPの可能性ある効果である。好ましい指標は、分離された植物葉緑体による酸素発生又は炭素固定又は分離された植物ミトコンドリアによる酵素吸吸、又は生きた細胞又は組織による酵素消費の抑制である。これら効果は、当業界で利用できる種々の手法及び装置、たとえばワーブルグ(Warburg)装置又は好ましくは酸素電極によりモニターできる。「The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes In Simple Measurements of Photosynthesis」D. Walker, 1987, Hansatech Ltd., Kings Lynn, Norfolk, England 参照。

40

反転ペプチド

50

RAMPPという言葉は、少なくとも一つの病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド (Reverse Antimicrobial Peptide active against at least one Pathogen) の略である。RAMPPPは、RAMPPのサブセットであり、少なくとも一つの植物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド (Reverse Antimicrobial Peptides which are active against at least one Plant Pathogen) の略である。上述のように或る抗菌性ペプチドの配列を反転することにより、著しい利点を持つRAMPPPを作ることができる。詳しくは、RAMPP及び特にRAMPPPは、病原体及び特に少なくとも一つの植物病原体に対する抗菌活性を持つようである。更に、特定のペプチドの配列を反転することにより、対応する正常な「前進」配列の欠点のいくつかを持たない抗菌性ペプチドをうることができる。

10

RAMPPPの文脈において、たとえば、対応する「前進」配列AMPPPに比べて、一つの植物プロテアーゼによる蛋白分解的滅成を著しく受けない及び／又は植物毒性でないペプチドが得られる。従って、これらペプチドは、植物病原性真菌及び／又はバクテリアから植物を保護するのに用いる見込みある候補である。

本発明に従い、同じであるが反転されたペプチド配列を持つRAMPPを作ることができ、例えば反転マガイニン1 (SEQ ID No. 9)、反転マガイニン2 (SEQ ID No. 10)、反転P1 (SEQ ID No. 13)、反転セクロピンA (SEQ ID No. 14)、ならびに反転PGL<sup>c</sup> (SEQ ID No. 7) 及び他のセクロピン、サルコトキシニン、ボンビニン、XPF、チオキン、デフェンシン、メリティン、及び同様の抗菌性ペプチドの反転形である。

20

本発明のRAMPPは、置換されていない天然に生じる抗菌性ペプチドを反転することに限定されない。適当な場合、或る置換、修飾及び／又は欠如がなされてよい。たとえば、(SEQ ID No. 11)を持つ反転ペプチドは、(SEQ ID No. 3)の構造を持つペプチドと同じであるが、正に反転した配列である；つまり、それらは、マガイニン1及び2に構造的に関連する化合物の反転ペプチドである。これらペプチドは位置Xaa<sup>1</sup>-Xaa<sup>3</sup>, Xaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>11</sup>-Xaa<sup>14</sup>及びXaa<sup>16</sup>-Xaa<sup>19</sup>において可変物を含み、ここでXaa<sup>1</sup>, Xaa<sup>2</sup>, Xaa<sup>3</sup>, Xaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>12</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>14</sup>, Xaa<sup>16</sup>, Xaa<sup>17</sup>, Xaa<sup>18</sup>及びXaa<sup>19</sup>は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValより成る群から選ばれる。好ましくは、(SEQ ID No. 11)のペプチドは天然のマガイニン1及び2に構造的に関連するRAMPPであり、ここでXaa<sup>1</sup>及びXaa<sup>3</sup>は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup>はArg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro、及びThr、より成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>5</sup>はAla, Gln, Glu, His, Met及びTrpから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はTrp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala、及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup>はLeu, Ile, Trp, Phe, Val, Ala及びGlyより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup>はPhe, Ile, Trp, Leu及びValより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup>はMet, Trp, Tyr, Gln, Lys, His, Pro, Ser及びArgより選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>14</sup>はGly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp、及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>16</sup>はAla, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>17</sup>はPhe, Ala, Met, Ser, Thr, Trp、

30

40

50

Tyr Gln、Lys、Asn、Glu、His、Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 8</sup>はAsn、Ile及びLeuより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 9</sup>はPhe、Ile、Leu、Trp及びValより成る群から選ばれたアミノ酸である。

本発明に従う他の置換されたRAMP Pとして、(SEQ ID No. 12) (ここでXaa<sup>1</sup>はSer、及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2</sup>はLys及びAsnより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はGly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 1</sup>はGly及びAlaより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 4</sup>はGly及びLysより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>1 6</sup>はSer、Ala、Glu及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>1 7</sup>はHis、Lys、Arg及びPheより成る群から選ばれたアミノ酸である)の構造を持つRAMP Pが挙げられる。

本発明の植物病原体に対して活性な抗菌性反転ペプチド(RAMP P P)を包含するRAMP Pは、一般にペプチドの化学的及び／又は遺伝子的合成に関して本明細書で述べられる手順に従って作ることができる。これらペプチドはまた、本発明に従いオリゴペプチド内に入れられることができる。また、本発明のオリゴペプチドの構造を全体に反転することが可能であり、かつ実際に有利でありうる。そうすることによって、反転ペプチドにより実現されると同様の利益を実現できる。また、これら反転ペプチドは、植物の根系に局所適用、注入、導入により、これら化合物を表現するであろう遺伝子を生成に入れそしてその表現を開始することにより、及び／又は同様のデリバリー法により、病原体に対して生物及び特に植物を保護するために、本明細書記載のように用いうる。

#### ペプチドモノマー

上記のペプチドモノマーならびに本明細書記載の他のものが、本発明に従うオリゴペプチドの構築に用いられうる。これらオリゴペプチドは、ペプチドポリマーはコポリマーを構築するのに用いられるペプチドモノマーとして概念化されうる複数のペプチドサブユニットから形成される。従って本明細書において、ペプチドモノマー及びモノマーという言葉は、本発明のオリゴペプチドを構築するのに特に有用なペプチドを云う。

オリゴペプチドの構築に有用な本発明のモノマーの一群は、上記のRAMP P及びRAMP P P、たとえば反転マガイニン1 (SEQ ID No. 9)、反転マガイニン2 (SEQ ID No. 10)、構造 (SEQ ID No. 12)を持つ反転マガイニン化合物、反転セクロピンA (SEQ ID No. 14)、反転PGL<sup>c</sup> (SEQ ID No. 15)及び反転P1 (SEQ ID No. 13)である。

本発明に従い有用な他のペプチドモノマーは、(SEQ ID No. 1)の構造を持つマガイニン1、(SEQ ID No. 2)の構造を持つマガイニン2、(SEQ ID No. 6)の構造を持つP1、(SEQ ID No. 7)の構造を持つPGL<sup>c</sup>、構造 (SEQ ID No. 8)のセクロピンAのようなセクロピン、サルコトキシン、ホンビニン、XPF、チオニン、デフェンシン、メリティン及び同様の抗菌性ペプチドである。

モノマー又はペプチドモノマーという言葉はまた、自体は抗菌性でないが、得られたオリゴペプチドの抗菌活性を高める、又はそれに他の利点を与えるペプチドを包含するものとして用いられる。たとえば、これらペプチドは、特に好ましいコンホメーション、アラインメント、特定の酵素に対する抵抗又は他の類似の利点を与えうる。

また、単一残基欠如誘導体、複数残基欠如誘導体、単一残基置換誘導体、複数残基置換誘導体、単一残基末端付加誘導体、及び適当な場合には直上で述べたペプチドのC末端アミドがまた、得られるペプチドアミドが得られるオリゴペプチドのC末端で用いられる限り、モノマーとして用いられうる。

本発明でペプチドモノマーとして有用な特に好ましい単一残基末端付加誘導体は、本発明のペプチドのC又はN末端にペプチド結合されたCysの付加を含むもの、又は上記ペプチドのいずれかのN末端にペプチド結合されていてよいMet又は(f)Metの付加を含むペプチドモノマーである。本発明のこの面に従う他の置換は、これらペプチドのN又

はC末端に付着されたSer又はHisを含む。

構造 (SEQ ID No. 3) (ここでXaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>10</sup>, Xaa<sup>11</sup>, Xaa<sup>12</sup>, Xaa<sup>13</sup>, Xaa<sup>18</sup>, Xaa<sup>19</sup>, Xaa<sup>21</sup>, Xaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>は、互に同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Cys, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValから成る群から選ばれるアミノ酸である) を持つペプチドの複数置換誘導体であるペプチドモノマーが、本発明で特に興味ある。好ましくは、これは可変物は、Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr及びValより成る群のアミノ酸から選ばれる。より好ましくは、本発明のペプチドモノマーは、(SEQ ID No. 3) (ここでXaa<sup>5</sup>はPhe, Ile, Leu, Trp及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>6</sup>はAsn, Ile及びLeuから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>7</sup>は、Phe, Ala, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>はAla, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>10</sup>はGly, Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met, Thr, Ser, Trp, Tyr, Gln, Lys, Asn, Glu, His, Asp及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>11</sup>はMet, Trp, Tyr, Gln, Lys, His, Pro, Ser及びArgから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>12</sup>はPhe, Ile, Trp, Leu及びValから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>13</sup>はLeu, Ile, Trp, Phe, Val, Ala及びGlyから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>18</sup>はThr, Trp, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, Gln, His, Met, Ala及びGlyから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>19</sup>はAla, Gly, Gln, His, Met, 及びTrpから成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>21</sup>及びXaa<sup>23</sup>は同じでも異ってもよく、Arg, Asp, Cys, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Thr, Trp, Met, Ser, Ala, Phe, Val, Ile, Leu及びProより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>22</sup>はCys, Arg, Asp, His, Glu, Lys, Gln, Tyr, Met, Asn, Ala, Pro, 及びThrより成る群から選ばれたアミノ酸である) の構造を持つペプチドを包含する。

本発明に従い有用でありうる他のペプチドモノマーは、自体が少くとも一つの植物病原体による減成に対し抵抗性であるものである。そのようなモノマーの一つはP1である。本発明者は、P1がAMP PPであることを見出した。すなわち、P1が少くとも一つの植物病原体に対し活性である化合物であることを本発明者は発見した。詳しくは、P1がエルウィニアカロトボラカロトボラのような植物病原性バクテリアに対して高度に活性であることを本発明者は見出した。本発明者はまた、P1が天然に生じる植物プロテアーゼによる消化に対して著しい抵抗を有し、かつ許容できるレベルの植物毒性を有することをも見出した。P1はセクロピンとして報告されているが、その起源 (昆虫でなブタの腸) 及びその異なる構造の故に別の分類が適当である。簡略化のために、本発明者は、この化合物を単にP1と表記することにした。リー (Lee) ら、[Antibacterial Peptides from Pig Intestines: Isolation of a Mammalian Cecropin] Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86, (1989) 9159-9162参照。

植物プロテアーゼに抵抗する他のペプチドモノマーは、本発明に従うRAMP PP及びRAMPP PPならびに構造 (SEQ ID No. 3) (ここでXaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>21</sup>, Xaa<sup>22</sup>及びXaa<sup>23</sup>から選ばれる基の少くとも一つは置換されている) のペプチドを包含する。好ましくは、Xaa<sup>11</sup>はPhe, Ala, His, Lys, Glu, Asp, Ser, 及びArgより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>8</sup>がTh



r, Asp, His, Ser, Ala, 及びGluより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 1</sup>がArg, Lys, His, Gln, Trp, Tyr, Thr, Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Glu, Asp, 及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、Xaa<sup>2 2</sup>がArg, Lys, Asn, His, Gln, Trp, Tyr, Ser, Thr, Pro, Cys, Ala, Gly, Glu, Asp, 及びMetより成る群から選ばれたアミノ酸であり、そしてXaa<sup>2 3</sup>がSer, Pro, Leu, Cys, Val, Ile, 及びTrpより成る群から選ばれたアミノ酸である。

本発明のペプチドモノマーとして有用な特に好ましい単一又は二個残基欠如誘導体は、構造 (SEQ ID No. 3) (ここでXaa<sup>5</sup>, Xaa<sup>6</sup>, Xaa<sup>7</sup>, Xaa<sup>8</sup>, Xaa<sup>1 0</sup>, Xaa<sup>1 1</sup>, Xaa<sup>1 2</sup>, Xaa<sup>1 3</sup>, Xaa<sup>1 8</sup>, Xaa<sup>1 9</sup>, Xaa<sup>2 1</sup>, Xaa<sup>2 2</sup>, 及びXaa<sup>2 3</sup>は同じでも異ってもよく、Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Crlu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, 及びValより成る群から選ばれる) を持つペプチドモノマーの単一及び二個残基欠如誘導体である。

本発明の別の面に従い、モノマー及びペプチドモノマーは、N又はC末端以外で単一のCysにより置換されている、少なくとも一つの病原体及び特に少なくとも一つの植物病原体に対し活性な抗菌性ペプチドを包含する。これは、これらペプチドが他の位置で他のアミノ酸により置換されていない又は欠除を含まないと云うのではなくて、得られる抗菌性ペプチドは一つの非末端Cysを含むと単に云っているのである。そのようなペプチドの例は、構造 (SEQ ID No. 1) (ここで位置7に通常見られるHisはCysで置換されている) 又は構造 (SEQ ID No. 2) (ここで位置7のHisはArgで置換され、位置8に通常見られるSerはCysで置換されている) のペプチドである。本発明のこの面におけるモノマーは、マガイニン関連化合物に限定されず、P1、セグロピンA、PGL<sup>o</sup> など及び／又は上述のRAMPPPのような抗菌性ペプチドにCys置換を含むことができる。すなわち、たとえば、本発明のモノマーは、構造 (SEQ ID No. 10) (ここでその第3番の位置に通常見られるMetはCysで置換されている) を持つペプチドを包含する。このペプチドはまた、付加がCysでない限りでN又はC末端付加を含むことができる。

#### 合成後修飾

上述したペプチド及びペプチドモノマーの種々の合成後修飾があり、これは一以上の病原体及び特に植物病原体に対するその有効性を改善できる。そのような合成後の修飾の一つは、本発明のAMPP、AMPPP、RAMPP、RAMPPP及びオリゴペプチドを含む種々のペプチドのカルボキシル末端のアミド化である。たとえばクエルボ等「The Magainins: Sequence Factors Relative to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity」Peptide Res. 1, (1988), 81-86参照。これらペプチドのアミド化は、一般にその抗菌活性を改善する。

本発明のペプチド、ペプチドモノマー及びオリゴペプチドの他の合成後修飾は、抗菌活性、蛋白分解的減成、及び／又は植物毒性への抵抗に関して有利であると判る。このような修飾は、DNA配列から生物学的表現により作られたペプチド及び／又はペプチドモノマーの翻訳後修飾を含む。そのような翻訳後修飾は、アセチル化、ボスホルル化、グリコシル化、ファルネシル化、アミド化、チロシンスルホン化、化学的又は酵素的手段による酸化たとえばメチオニン残基の酸化、プロリン又はチロシンヒドロキシル化及び／又はプロリン異性化を含み、しかしこれらに限定されない。

#### オリゴペプチド

本発明のオリゴペプチドは、二以上のペプチドサブユニット又はペプチドモノマー、及び任意的に一以上のブリッジ及び／又はジスルフィド連結を含む蛋白質である。より詳しくは、本発明のオリゴペプチドは、ペプチド結合により直接に又はブリッジ化分子及び／又はジスルフィド連結の使用によって接続された少なくとも二つのペプチドサブユニット又は



ペプチドモノマーを含む。

本発明のオリゴペプチドの正確な性質及び作用の様式は完全には判っていない。しかし、これにより限定されるものではないが、これら化合物はペプチドモノマーの活性な集合体の形成を促進しうる。それらはまた、蛋白分解的滅成に低感受性である又は低植物毒性である、又はこの両者である構造を作りうる。理論又はメカニズム、又はそれらの作動の後にある理論にかかわらず、本発明者は、本発明のオリゴペプチドが病原的微生物に対し及び特に微生物的植物病原体に対して、対応するモノマーと同等に又はそれ以上に活性であることを見出した。

本発明に従う構造的に最も単純なオリゴペプチドは、いわゆる頭尾二量体オリゴペプチドである。これら二量体は、第一のペプチドモノマーのC末端残基が第二のペプチドモノマーのN末端位置のアミノ酸にペプチド結合で結合されるように、N及びC末端を持つ第一のペプチドモノマーとやはりN及びC末端を持つ第二のペプチドモノマーとの直接ペプチド結合を含む。

これら頭尾二量体は、少くとも一つの病原体及びより好ましくは少くとも一つの植物病原体に対して活性である。この点で、頭尾二量体は、本明細書記載の他のオリゴペプチドと同じである。また、本発明に従い頭尾二量体を構造する二つのペプチドサブユニットの夫々は、自体単独で抗菌性である。すなわち、頭尾二量体オリゴペプチドで用いるべく選択されるペプチドモノマーは、抗菌性を欠くペプチドモノマーを含まない。

本発明の好ましい頭尾二量体は、二つのサブユニット及び従って少くとも一つの第一の及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーが (SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2) 又は (SEQ ID No. 3)、(SEQ ID No. 6) のどちらかの構造を持つところのものである。

本発明の特に有利な頭尾二量体は、構造 (SEQ ID No. ) 及び (SEQ ID No. 6) を持つペプチドの群から作ることができる。上述のように、本発明者は、P1が植物病原性バクテリアに対するその活性の故のみでなく、蛋白分解的滅成に対するその天然の抵抗性の故に、AMP PPとして有用であることを見出した。P1はまた、モノマーとして植物毒性が天然に低い。しかしP1は、その抗菌性インパクトの点で幾分限定されている。従って、少くとも一つの植物病原体に対して活性でありかつ蛋白分解的滅成に対し比較的抵抗性であるように好ましくは修飾された、修飾されたマガイニンとの二量体形でのその組合せは、生物及び特に植物及び植物組織の防禦のための有能なオリゴペプチドを提供する。得られるオリゴペプチドはまた、許容できる植物毒性を示す。

本発明の他の特に好ましい頭尾二量体は下記を包含する。(SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2); (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1); (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 2) \*\*\*; (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1) \*\*\*; Met - (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 6) - (SEQ ID No. 1) \*\*\*; (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 7) \*\*\*; Met - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 9); (SEQ ID No. 6) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; (SEQ ID No. 10) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; Met - (SEQ ID No. 7) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* - (SEQ ID No. 1); 及び Met - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* - (SEQ ID No. 6)。ここで\*\*\*は、特定されるペプチドモノマーが順序を反転されうることを示し、\*\*\*\*は、特定されるペプチドモノマーが順序を反転されることができ、かつXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeuであり、Xaa<sup>7</sup>はHis、Lys、Phe、Ser及びArgより成る群から選ばれ、Xaa<sup>8</sup>はSer、His、Thr、Ala及びGluからなる群から選ばれ、Xaa<sup>10</sup>はGly及びLysからなる群から選ばれ、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPheであり、Xaa<sup>13</sup>はGly及びAlaより成る群から選ばれ、xaa18はGly及びA. laより成る群から選ばれ、xaa19はGlu、

Xaa<sup>2 1</sup> はMetであり、Xaa<sup>2 2</sup> はAsn及びLysより成る群から選ばれ、Xaa<sup>2 3</sup> はSer及びProより成る群から選ばれる構造を持つことを示す。[Des (Gly 1, Ile 2)] Mag 2, [Des (Gly 1, Ile 2)], Arg 7, Glu 8, Pro 23] Mag 1, [Des (Lys 22, Ser 23)] Mag 1及びこれらの誘導体を包含する、上記モノマーの単一及び複数残基欠如誘導体もまた考えられる。

本発明の頭尾三量体及び他の延長された頭尾多量体は、少くとも一つの第一のペプチドモノマー及び少くとも一つの第二のペプチドモノマーを含まねばならず、その夫々は少くとも一つの病原体及び好ましくは少くとも一つの植物病原体に対し活性である。好ましくは1〜約14の員である残りのペプチドサブユニットもまた、抗菌性ペプチド及び／又はAM PPPでありうる。最も好ましい頭尾オリゴペプチドは、抗菌性ペプチドモノマーのみを含む。しかし、残りのペプチドサブユニットが抗菌性を持つ必要はない。特に好ましい頭尾オリゴペプチド多量体の例は下記のものである。(SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1); (SEQ ID No. 1) 4; (SEQ ID No. 2) 6; (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2); (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 1) \*\*\*; (SEQ ID No. 1) - [(SEQ ID No. 2)] 4 - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*; and (SEQ ID No. 7) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 9) \*\*\*; ここで“\*\*\*”及び“\*\*\*\*”は上記と同じ意味を持つ。

直上で述べたオリゴペプチドと構造的に類似のオリゴペプチドの別のタイプは、いわゆるブリッジされたオリゴペプチドである。これらブリッジされたオリゴペプチドは、オリゴペプチドを構成するペプチドモノマーサブユニットの少くとも二つが介在するブリッジにより隔てられていることを除き、直上で述べた頭尾オリゴペプチドと同じでありうる。すなわち、その最も単純な形において、本発明のブリッジされたオリゴペプチドは、少くとも一つの第一の及び少くとも一つの第二のペプチドモノマー、及びブリッジより成る。該少くとも一つの第一のペプチドモノマーのC末端は、ブリッジのN末端に直接にペプチド結合され、ブリッジのC末端は上記少くとも一つの第二のペプチドモノマーのN末端に直接にペプチド結合されている。得られる構造は、(SEQ ID No. 2) - ブリッジ (SEQ ID No. 2) の構造を持つ二量体のブリッジされたオリゴペプチドと表わされることができ、これは二つのマガイニン2サブユニットのブリッジされた二量体であり、ここで「-」は本発明に従うブリッジ化ペプチドである。

本発明のこの面に従う構造的に最も簡単なブリッジされた多量体は、一つのブリッジを持つ三量体である。たとえば、もし構造 (SEQ ID No. 1) を持つペプチドモノマーがそのC末端を介して、上述のブリッジされた二量体において第2のマガイニン2のC末端に直接付着されると、得られるオリゴペプチドは構造 (SEQ ID No. 2) - ブリッジ (SEQ ID No. ) - (SEQ ID No. 1) を持つであろう。しかし、ブリッジされた三量体が単一のブリッジ化分子に限定される必要はない。たとえば、直上で述べた構造は、追加的ブリッジの使用によって変更されることができ、得られる三量体のブリッジされたオリゴペプチドは (SEQ ID No. 2) - ブリッジ<sub>1</sub> - (SEQ ID No. 2 - ブリッジ<sub>2</sub> - (SEQ ID No. 1) を持つであろう。ブリッジ<sub>1</sub> とブリッジ<sub>2</sub> は、同じでも異ってもよい。

本明細書においてブリッジという言葉は、オリゴペプチド内の二つのペプチドサブユニットを隔てるために用いられる、アミノ酸に基づく分子を包含する。本発明におけるブリッジは、N及びC末端を持ち、従って慣用のペプチド結合によってペプチドサブユニットの各々に結合されるところの分子である。

本発明におけるブリッジは、種々の長さ及び組成であることができる。しかし、その長さ及び組成に係わらずに、本発明のブリッジは、特定のオリゴペプチド中のモノマー間の分子内相互作用を促進できるものでなければならない。また、ブリッジは、ブリッジされたオリゴペプチド内の望ましくない細胞事象たとえばホスホリル化又はグリコシル化 (この

ようなプロセスが不利であるなら) に対する抵抗を与える又は最小化することができるように、選択されねばならない。本発明の特に好ましい面において、ブリッジは、ブリッジされたオリゴペプチドが細胞膜及び特に真核植物細胞の細胞膜を通して動ける能力を妨害してはならない。即ち、本発明の好ましいブリッジされたオリゴペプチドは、細胞外空間に輸送されうる。

本発明のオリゴペプチドは、いくつかの利点を持つ。そのより重要なものの一つは、病原体に対する保護を与えるこれら蛋白の能力である。上述のように、本発明者は、この抗菌活性のメカニズムを完全に判っている訳ではない。しかし、特定の作用理論に限定されるものではないが、本発明者は、この活性は、病原体の細胞膜において集合体及び膜破壊的チャンネルを形成するペプチドの能力に関係すると考えている。これら現象を促進するオリゴペプチドの能力は、個々のオリゴペプチド及び実際に多くの場合に相互作用する複数のオリゴペプチドのサブユニットの能力に少なくとも部分的に依存するようである。

これに従う頭尾オリゴペプチドは分子間相互作用及び／又はオリゴペプチド間相互作用により有益な集合体を促進する能力を示しうるが、一方、本発明のブリッジの使用により得られる結局は、少なくとも植物病原性微生物に対するオリゴペプチドのより大きな活性（関連するAMPPPモノマーサブユニットに比べ）さえ示す。この現象の説明の一部は、種々のオリゴペプチド成分の分子内ダイナミックスにあるかも知れない。たとえば、頭尾二量体(SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 2)は、高められた活性を持つことが判った。これは、二つのペプチドモノマーを結びつけているペプチド結合を取囲む領域の「フレキシビリティ」によるかも知れない。この領域が有利な二次及び三次コンホメーションを許す故に、結合されたペプチドモノマーは相互作用を許される。この相互作用は、モノマーの一部が遷移的期間でさえ、相対的に極近接して置かれる能力に部分的に依存する。極近接という言葉は、少なくとも第一の及び少なくとも第二のペプチドモノマーの夫々のある部分が互に約10オングストローム未満、より好ましくは互いに約7オングストローム未満内にもたらされることを意味する。

本発明者は、ブリッジの使用が活性の更なる向上を与えることを見い出した。即ち、ブリッジの使用は、おそらく、オリゴペプチドのサブユニット内の分子間相互作用を促進する。本発明に従うブリッジは、種々の方法でこれを達成しうる。

ブリッジ（小さいものさえ）の使用は、個々のモノマー内に十分な空間を与えて、不利な立体障害を除く、又は有利な分子間相互作用を高めるであろうエネルギー的に安定な結合の形成を与えうる。更に、或るブリッジの使用は、有利なコンホメーションの形成を許すに十分な程度のフレキシビリティをオリゴペプチドに与えうる。即ち、フレキシビリティを与えることにより、ペプチドモノマー間に有利な間隔を与え、そしてモノマー間相互作用を許すことができる。他の可能性は、「フレキシブル」ではないけれども、有利なモノマー間相互作用を促進する位置にペプチドモノマーを置く特定のコンホメーションを与えるブリッジの使用である。

本発明者は、5つ以下のアミノ酸の比較的小さなブリッジが、本発明に従うオリゴペプチドの構築に特に有用であることを見い出した。これらブリッジは、モノマー間相互作用を更に促進する運動範囲を許し、又はそのような相互作用を直接促進する又は与える二次構造を提供するのに十分なフレキシビリティを、得られた構造に与える。

本発明者はまた、得られたオリゴペプチドの構造を抑制しそしてモノマー間の可能性ある相互作用を阻げるかも知れない望ましくないペプチド二次構造、たとえばアルファヘリックス又はベータストランドは一般に5より多いアミノ酸長さを必要とすることを見い出した。W. カブシュ(Kabsch)とC. サンダー(Sander), 「Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical figures」Biopolymers 22, (1983), 2577-2637およびR. ムスサミイ(Muthusamy)とP. K. ポヌスワミイ(Ponnuswamy), 「Variation of amino acid properties in protein secondary structures

、alpha-helices and beta-strands」, Int. J. Peptide Protein Res. 38, (1990), 378-395を、天然蛋白におけるアルファヘリックス及びベータストランドの分析に関し参照されたい。

本発明の好ましいブリッジの一つは、(SEQ ID No. 5 (ここでXaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> は独立に、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、Pro、Ser、Thr、Tyr及びValより成る群から選択される)の構造を持つ。特に好ましいブリッジは、Xaa<sup>1</sup> がGly、Xaa<sup>2</sup> がGly、Xaa<sup>3</sup> がSer、Xaa<sup>4</sup> がSer、Xaa<sup>5</sup> がGlyのもの、又はXaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> が総てアミノ酸Glyであるものである。5つのアミノ酸を含む他の好ましいブリッジは、(SEQ ID No. 5) (ここでXaa<sup>1</sup> がGly、Xaa<sup>2</sup> がArg、Xaa<sup>3</sup> がArg、Xaa<sup>4</sup> がPro、Xaa<sup>5</sup> がGlyである)の構造を持つ。Glyに富むブリッジである後者は、溶液中でフレキシブルであると予想される。なぜなら、Gly側鎖部分は、オリゴペプチドの何らかの有りうるたたみ込みを立体的に阻げて、オリゴペプチドのペプチドサブユニットの間のモノマー間相互作用を許しかつ事実促進することはなさそうであるからである。その結果は、標的病原性微生物に対するオリゴペプチドの活性の増大である。また、Gly側鎖分子は、有益なモノマー間相互作用を妨害しうる水素結合又は静電荷ブリッジのようなエネルギー的に安定な構造又は相互作用に参加できない。同様に、種々の二次構造予測アルゴリズム[W. カプシュ及びC. サンダー [Biopolymers 22 (1984) 2577-2637; J. Garnier et al., J. Mol. Biol. 120 (1978) 97-120; 及びP. Y. Chou & G. D. Fasman, Biochemistry, 13 (1974) 211-222 参照]により予測されるように水性溶液中でフレキシブルであることができ、かつGlyに富むペプチドブリッジは、従って本発明にとって許容できるであろう。ブリッジされたペプチド配列の好ましい例は(これらに限定されないが)、1~5のアミノ酸を含む下記のものである。Ser-Ser-Gly-Gly、Ser-Ser-Gly-Gly-Gly、Ser-Gly-Gly-Ser、Ser-Gly-Ser-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、Gly、Gly-Glyなど。

好ましいブリッジペプチド又はより好ましいブリッジペプチドのサイズ要求を満たしうるブリッジペプチドの多数の他の組成がある。好ましい組成は、ベータターンを含むものであるが、これに限定されない(B. L. Sibanda及びJ. M. Thornton, Nature, 316, (1985), 170-174; 及びJ. S. Richardson及びD. C. Richardson, 前出、を参照)。

同様に、単一アミノ酸ブリッジたとえば二つの抗菌性ペプチドモノマーの間のブリッジとしての単一のGlyの使用は、本明細書に記載したタイプのモノマー間相互作用を促進するのに十分なフレキシビティ及び/又は十分な二次構造を与える。

ブリッジは、本発明に従い有効であるために5以下のアミノ酸に限られる必要はない。しかし、より大きいブリッジは得られるオリゴペプチドに望ましくない二次及び/又は三次コンポメーションを与えるかも知れないので、本発明のオリゴペプチドの種々のペプチドサブユニット間のモノマー間相互作用を与える又は促進するであろうブリッジのみを選択することが重要である。

本発明で有用なより長いブリッジの群は、ヘリックス結合ペプチドユニットたとえばトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメイン、ループ又は他のフレキシブル結合ペプチド鎖を含む。本発明で有用なトランスメンブラン蛋白質の細胞外ドメインは、約6~約100のアミノ酸の種々の長さである。細胞又は細胞膜内にあるドメインではなくて、これらドメインは、それらが細胞膜を通して輸送されることができ、従って、モノマー間相互作用を促進するだけでなく、細胞外空間への排せつをも促進するので、有用である。また、これら細胞外ドメインは、ある場合に、本明細書で述べるシグナル又は標的蛋白として働きうる。K. ベルナー (Verner) 及びG. シャッツ (Schatz), 「Protein Translocation Across Membranes」Science 241, (1988), 1307-1313; L. Gierasch, 「Signal

Sequences] Biochemishy 28, (1989), 924-930; 及び van Heijine、前出、参照。

天然に知られている多くのそのような細胞外ドメイン、たとえば (SEQ ID No. 16) 又は (SEQ ID No. 17) の構造を持つペプチドがある。

本発明に従いオリゴペプチドを形成するにおいてブリッジとして有用でありうる別の公知の細胞外ドメインは、下記に同定されている。P. R. Schofieldら、"Se-

quence and Functional Expression of the GABAA Receptor Shows a Ligand-Gated Receptor super-Family," Nature 328, (1987), 221-227; J. E. O'Tousaら、"The Drosophila ninaE Gene Encodes an Opsin," Cell 40, (1985), 839-850; A. Vassarottiら、"Independent Mutations at the Amino Terminus of a Protein Act as Surrogate Signals for Mitochondrial Import," EMBO J. 6, (1987), 705-711; J. P. Adelmanら、"Isolation of The Gene and Hypothalamic cDNA for the Common Precursor of Gonadotropin-Releasing Hormone And Prolactin Releases-Inhibiting Factor in Human and Rat," Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 83, (1986), 179-183; C. S. Zukerら、"Isolation and Structure of a Rhodopsin Gene from D. melanogaster," Cell 40, (1985), 851-858; H. Vogelら、"The Structure of the Lactose Permease Derived from Roman Spectroscopy and Prediction Methods," EMBO J. 4, (1985), 3625-31; T. J. Jentschら、"Primary Structure of Torpedo marmorata Chloride Channel Isolated by Expression Cloning in Xenopus Oocytes," Nature 348, (1990), 510-513; A. Kambら、"Molecular Characterization of Shaker, a Drosophila Gene that Encodes a Potassium Channel," Cell 50, (1987), 405-413; A. Baumannら、"Molecular Organization of the Material Effect Region of the Shaker Complex of Drosophila; Characterization of an I<sub>1</sub> Channel Transcript with Homology to Vertebrate Na<sup>+</sup> Channel," EMBO J. 6, (1987), 3419-29; T. Tanabeら、"Primary Structure of the Receptor for Calcium Channel Blockers from Skeletal Muscle," Nature 328, 1987, 313-318; U. B. Kauppら、"Primary Structure and Functional Expression from Complementary DNA of the Rod Photoreceptor Cycle GMP-gated Channel," Nature 342, (1989), 762-766; M. Nodaら、Nature 322, (1986), 826-828.

オメガループは、規則立った構造を持たず、その端から端までの距離が約10オングストローム未満である、一般に約6〜約16のアミノ酸の長さの構造である。いくつかのオメガループは、もっと長い。これらループのいくつかは、細胞外ドメインとしても分類できる。天然に知られている多数のそのようなループ、たとえばファージT4リゾチームの

j p. 48部分(残基134~139)(SEQ ID No. 18)又は*Bacillus stearothermophilus thermolysin*の一部(残基188~203)(SEQ ID No. 19)がある。本発明に従いオリゴペプチドを形成するにおいてブリッジとして有用でありうる他の公知オメガグループは、J. F. レジンスキー及びD. G. ローズ(J. F. Leaczynski及びG. D. Rose), "Loops in Globular Proteins: A Novel Category of Secondary Structure," *Science* 234, (1986), 849-855に同定されている。本発明のオリゴペプチドで用いられるとき、これらオメガグループは、モノマーを十分に近接させることによってモノマー間相互作用を促進しうる。

10

本発明に従いブリッジとして用いうる他のフレキブルな接続ペプチド鎖は、たとえば(SEQ ID No. 23)の構造を持つペプチドである。J. S. ヒューストン(Huston)ら、「Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-digoxin single-chain Fv analog produced in *Escherichia coli*」*Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)* 85, (1988), 5879-843参照。

本発明の好ましい実施態様において、そのようなより長い鎖のブリッジは、一つのオリゴペプチド内の少くとも二つのペプチドモノマーの間隔を与え又は促進して、約10オングストローム、より好ましくは約7オングストローム内に互を置くことができる。J. S. リチャードソン(Richardson), "The anatomy and taxonomy of protein structure," *Adv. Protein Chem.* 34, (1981), 167-339及びJ. S. リチャードソンとD. C. リチャードソン, "Principles and Patterns of protein conformation," in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (G. D. ファスマン編集; Plenum Press, New York, NY), pp. 1-98 (1989)を、上記いくつかの段落に述べたペプチド又は蛋白の二次構造要素の定義及び検討のために参照されたい。

20

従って、本発明のブリッジは、1つのアミノ酸のように小さくてもよく、また100のアミノ酸のように大きくてもよい、しかし、より好ましくは、ブリッジは約1~約20のアミノ酸を含む。ブリッジの長さは、多数の因子に基いて変わりうる。

30

本発明の好ましい実施態様において、ブリッジは、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValから成る群から選ばれることができる一つのアミノ酸である。

本発明のこの面でのより好ましい実施態様において、ブリッジはAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、and Valより成る群から選ばれた一つのアミノ酸から成る。本発明で特に好ましくはブリッジは、Gly、Ala又はSerである

40

。2~4のアミノ酸を持つブリッジも、オリゴペプチドの作成のために有利に用いうる。これらブリッジで用いられるアミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValから成る群から選ばれることができる。より好ましくは、アミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Tyr及びValから成る群から選ばれる。

本発明の好ましいブリッジは、(SEQ ID No. 4)(ここでXaa<sup>1</sup>~Xaa<sup>4</sup>は直上で述べたように置換されてもよい)の構造を持つものを包含する。得られるブリッ

50

ジは、Xaa<sup>1</sup> が Gly、Ser、Asn 又は Lys、Xaa<sup>2</sup> が Gly、Lys、Asp、Ala 又は Arg、Xaa<sup>3</sup> が Gly、Glu、Thr 又は Ser、Xaa<sup>4</sup> が Gly、Glu、Pro 又は Ser であるものを包含する。一以上の Cys アミノ酸を含むブリッジも含まれる。2~4 のアミノ酸長さのブリッジは、たとえばベータターンを形成するペプチドたとえば、Gly-Gly、Ser-Lys、Ser-Gly、Asn-Lys-Glu-Glu、及び Ser-Asp-Gly-Pro、ならびに他のペプチド、たとえば Ser-Ser、Gly-Arg-Ser、Ala-Lys-Ala、Lys-Ala-Thr-Glu、及び Gly-Arg-Ser-Ser を包含する。

2~5 のアミノ酸長さを含む他のブリッジは Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、及び Val より成る群から選ばれたアミノ酸より構成されるものである。より好ましくは、アミノ酸は、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Pro、Ser、Thr、Tyr、及び Val より成る群から選ばれる。

本発明の好ましい他のブリッジは、(SEQ ID No. 5) (ここで Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> は上記の群から選ばれることができる) の構造を持つものである。好ましい実施態様において、この5員ブリッジは、Gly、Ala、His、Lys、Ser、Arg 及び Pro より成る群から選ばれ、構造 (SEQ ID No. 5) の特に好ましいブリッジは、Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> が Gly であるものである。

本発明に従ういくつかの代表的ブリッジは、下記を包含するが、これらに限定されない。

(SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 1) ; (SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 2) ; (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 20) \*\*\* ; (SEQ ID No. 1) - Ala - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; (SEQ ID No. 1) - (Gly) 3 - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 4) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - Cys-Gly-Gly - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - Gly-Gly-Gly - (SEQ ID No. 1) ; (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 1) - (SEQ ID No. 7) \*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 3) \*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - Gly - (SEQ ID No. 3) - Gly - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; (SEQ ID No. 3) - Gly - (SEQ ID No. 3) - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\* ; and (SEQ ID No. 20) - (SEQ ID No. 4) - (SEQ ID No. 9) - (SEQ ID No. 3) \*\*\*\*、ここで “\*\*\*” 及び “\*\*\*\*” は上述と同じ意味を持ち、(SEQ ID No. 5) の Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>5</sup> は、(SEQ ID No. 4) の Xaa<sup>1</sup> ~ Xaa<sup>4</sup> と同様に、夫々 Gly である。

ブリッジするペプチドを用いずに、そして事実、ペプチド結合でペプチドサブユニットを結合することなしに、オリゴペプチドを構成することもできる。詳しくは、本発明のオリゴペプチドを、ジスルフィド結合、又は隣接サブユニットの末端における適当に配置された Gly アミノ酸の酸化から得られる接続により、個々のペプチドサブユニットを結合することによって作ることができる。

本発明のこの面に従うオリゴペプチドは、上記したものと違って、二つの隣接するペプチドサブユニットの各 N 又は C 末端が互にジスルフィド結合されて、頭頭又は尾尾配置で結合されることができる。これは、接続されるべき二つの隣接ペプチドモノマー夫々の N 又は C 末端に Cys を付着する (すなわち、本発明に従う種々のペプチドモノマーの二つの単一残基 C 又は N 末端付加導体を用いる)、又は特定のペプチドに含まれる個々の N 又は C 末端アミノ酸を Cys で置き代える (すなわち、二つの単一又は複数残基置換誘導体を



結合する) ことによって達成しうる。

本発明に従うジスルフィド結合されたオリゴペプチドの第一の形 (即ち、頭頭) の例は、夫々がN末端Glyに付着されペプチド結合されたCysを有する、(SEQ ID No. 1) の構造の二つのペプチドから作られた二量体である。二つのN末端Cysは、ペプチドモノマーのように、ジスルフィド結合により結合される。

本発明に従うジスルフィド結合されたオリゴペプチドの第二の形 (即ち、尾尾) の例は、(SEQ ID No. 3) (ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>18</sup>はGly、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>20</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はCysである) の構造を持つ二つのペプチドのジスルフィド結合を含む。マガイニン1のこれら第一残基置換誘導体はすると、二つのC末端Cysの間に形成されるジスルフィド結合により結合される。

上記の例で用いたペプチドモノマーは、ジスルフィド結合されたオリゴペプチドを形成するように組合わされてもよい。たとえば、用いられる少くとも一つの第一のペプチドモノマーは、(SEQ ID No. 3) (ここでC末端アミノ酸 (通常はSer) がCysで置き換えられ、つまり置換されている) の塩基構造を持つ上記の単一残基置換誘導体であり、そして少くとも一つの第二のペプチドモノマーは、たとえば (SEQ ID No. 2) (ここでCysはそのC末端Serにペプチド結合されている) の構造を持つペプチドの単一残基C末端付加誘導体でありうる。すると、ジスルフィド結合は、二つのC末端Cysアミノ酸の間に形成されることができ、本発明に従う尾尾ジスルフィド結合された二量体オリゴペプチドが作られる。

本発明に従うジスルフィド連結されたオリゴペプチドはまた、頭尾配置で結合されてもよい。たとえば、構造 (SEQ ID No. 3) を持ち、かつC末端アミノ酸をCys置換された第一のペプチド及びN末端に付着されたCysを持つ (SEQ ID No. 1) の第二のペプチドは、ジスルフィド連結により結合されて、二量体オリゴペプチドを形成できる。このオリゴペプチドは、構造 (SEQ ID No. 3) -S-S-Cys- (SEQ ID No. 1) ここで (SEQ ID No. 3) についてXaa<sup>5</sup>-Phe、Xaa<sup>6</sup>-Leu、Xaa<sup>7</sup>-His、Xaa<sup>8</sup>-Ser、Xaa<sup>10</sup>-Gly、Xaa<sup>11</sup>-Lys、Xaa<sup>12</sup>-Phe、Xaa<sup>13</sup>-Gly、Xaa<sup>18</sup>-Gly、Xaa<sup>19</sup>-Glu、Xaa<sup>21</sup>-Met、Xaa<sup>22</sup>-Lys、及びXaa<sup>23</sup>-Cys、を持つであろう。

好ましくは、本発明のオリゴペプチドは、単一のみのジスルフィドブリッジを持つ。即ち、たとえば、一つのジスルフィドブリッジを持つオリゴペプチドは、上述したような頭尾配置で直接結合された他のペプチドサブユニット、及び/又は上述のようにブリッジで結合されてもよい追加的ペプチドサブユニットを含みうる。

これらオリゴペプチドの例としては、下記が挙げられるが、これに限定されない。

HO-(SEQ ID NO. 20)\*-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH;

H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)\*-NH<sub>2</sub>;

H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 9)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 1)-OH;

H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH;

H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)-(SEQ ID NO. 5)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 20)-OH;

H<sub>2</sub>N-Met-(SEQ ID NO. 20)4-(SEQ ID NO. 1)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 2)-OH;

H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 20)4-(SEQ ID NO. 9)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 10)-OH;

10

20

30

40

50

H<sub>2</sub>N-(SEQ ID NO. 1)-(SEQ ID NO. 15)-(SEQ ID NO. 3)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 9)-(SEQ ID NO. 5)-(SEQ ID NO. 20)-OH.

上述のように、「-」はペプチド結合を示し、「-S-S-」はジスルフィド結合を示し、「\*」は反転された位置でのペプチドを示す。

隣接ペプチドサブユニット間にジスルフィド結合を与える方法としての末端Cysの使用はまた、同じ末端Cysがペプチド結合により他のペプチドに更に結合する可能性を許す。ここで「他のペプチド」とは、単一のアミノ酸残基のような小さな構造、及び少なくとも一つの病原体に対し活性なペプチドを含む。それは、全く不活性なペプチドでもよい。従って、特定のCysがペプチド結合により二つのペプチドに機能的に結合され（その一つがペプチドモノマーである）、また少なくとも一つの他のペプチドモノマー上に含まれるCysにジスルフィド結合により結合されている枝分れしたオリゴペプチドを作ることができる。そのようなペプチドの例は、少なくとも一つの第一のペプチドモノマーが構造(SEQ ID No. 1)を持つペプチドの単一残基C末端付加誘導体であり、かつ少なくとも一つの第二のペプチドモノマーが構造(SEQ ID No. 2)のペプチドの単一残基N末端付加誘導体であり、かつたとえば構造(SEQ ID No. 6)のもう一つのペプチドが備えられるところのオリゴペプチドを包含する。得られるペプチドは、下記のように示される。

(SEQ ID NO. 1)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 2)

↓  
(SEQ ID NO. 6)

(ここで「-」はペプチド結合を示し、「-S-S-」はジスルフィド結合を示す。  
このタイプのオリゴペプチドの他の例は、下記の構造を持つ。

(SEQ ID NO. 1)-Cys-S-S-Cys-(SEQ ID NO. 2)\*

↓  
(SEQ ID NO. 4)

ここで、アスタリスクは、反転されたペプチド（この例ではCysの単一残基C末端付加を持つ(SEQ ID No. 2)の反転形）を示し、「-」はペプチド結合を示し、「-S-S-」はジスルフィド結合を示す。

第一の例は、ジスルフィド結合されたペプチドモノマーについて頭尾配置を含み、第二の例は、尾尾配置を示す。本発明に従う別のオリゴペプチドは、内部的にCysで置換された少なくとも一つのペプチドモノマーを含む。即ち、これらオリゴペプチドは、N又はC末端以外でCysにより置換された少なくとも一つのモノマーを用いる。従って、各ペプチドモノマーの内部部分内でペプチドを「架橋」することができる。たとえば、夫々が位置22でCysにより置換された（即ち、位置Xaa<sup>22</sup>で通常のAsnをCysで置換）ところの構造(SEQ ID No. 2)を夫々持つ二つのペプチドモノマーがジスルフィド結合されうる。あるいは、一つの内部的にCys置換されたペプチドモノマーは、上述したN又はC末端Cysモノマーにジスルフィド結合により連結されうる。そのようなオリゴペプチドの例は、構造(SEQ ID No. 2)-Cys（すなわち、マガイニン2の単一残基C末端付加誘導体）を持つ第一のペプチドモノマー及び構造(SEQ ID No. 2)（ここでたとえば、位置Xaa<sup>22</sup>のAsnはCysで置換されている）を持つ第二のモノマーのジスルフィド結合を介する連結を含む。すると、これらモノマーは、二つのCysアミノ酸の間に形成されたジスルフィド結合により接続される。

本明細書で定義したブリッジ及びジスルフィド結合の両者を含むブリッジ化構造を持つオリゴペプチドを作ること、本発明に従い有利である。即ち、たとえば、構造(SEQ ID No. 3)-S-S-Cys-(SEQ ID No. 4)-(SEQ ID No. 2)〔ここで(SEQ ID No. 3)中のXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はCys、Xaa<sup>10</sup>はGly、Xaa<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はGly、Xaa<sup>18</sup>はGly、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はLysそしてXaa<sup>23</sup>はSerであり、そして(SEQ

Q ID No. 4) の  $Xaa^1 \sim Xaa^4$  は夫々 Gly である] を持つオリゴペプチドを作ることができる。ジスルフィド結合は、第一のペプチドモノマーの位置 8 の Cys と、第二のモノマーに付着された、5 つの Gly を含むブリッジに付着された N 末端 Cys の間に形成される。複数のブリッジユニットを含めることも有用であり、たとえば得られる構造は次の通りである。(SEQ ID No. 2) - (SEQ ID No. 5) - Cys - S - S - Cys - (SEQ ID No. 5) - (SEQ ID No. 3) 又は (SEQ ID No. 2) - Ala - Cys - S - S - Cys - Gly - (SEQ ID No. 2) \*

ここで「\*」は、反転された位置のペプチドを示す。

#### 相補的ペプチド混合物

バスコムら (前出) は、公知の抗菌性ペプチドの構造を修飾する試みにおいて、或るペプチドが、一つの特定の病原体又は病原体群に対する有効性を失い、同時の他のものに対する活性を少くとも実質上失わないことを発見した。即ち、たとえば、構造 (SEQ ID No. 2) (ここで位置 8 の Ser は Glu で置換されている) を持つペプチドは、マガイニン 2 と比べて、植物病原性真菌に対し比較的活性なままである。しかし、修飾は予期せざるにかつ有利なことにも、得られたペプチドの蛋白分解的減成への感受性を 50 % 以上減少し、またペプチドの植物毒性を 50 % 減少した。不幸にも、このペプチドは、少くとも一つの植物病原性バクテリアに対する有効性を大きく失った。同様に、本発明者は、公知の天然に生じるペプチド P 1 が植物病原性バクテリアに対して AMPPP のように高度に有効であり、かつ植物毒性及び蛋白分解感受性が非常に低いことを見出した。しかし、P 1 は、少くともいくつかの植物病原性真菌に対し、極少ししか有効でない。これら観察及び発見は、直上の述べた二つのような組成物を組合せて、得られる混合物が単独のペプチドの使用で達成できるよりもはるかに広いスペクトルの抗菌性を持つという概念へと導く。従って、これら二つの組成物の一体化の効果は、相補的である。

本発明のこの面における抗菌性組成物は、一つの群の病原体に対して比較的活性であり、他の群の病原体に対して比較的低下した活性を少くとも一つの第一の抗菌性ペプチド、及び上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的の不活性であるところの病原体の群に対して比較的活性であり、かつ上記少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが比較的活性であるところの病原体の群に対して比較的の不活性である少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドを含む。

ペプチドという言葉が、本発明のこの面で (つまり相補的ペプチド混合物に関して) 用いられるとき、相補的ペプチドのような「ペプチドモノマー」を意味しているのではない。活性な形において、相補的ペプチドは互に結合されることを意図されていず、従って「モノマー」ではない。少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドも、少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドも、植物病原体に対して活性である必要はない。しかし、上述の少くとも一つが少くとも一つの植物病原体に対して活性であることが好ましく、またより好ましくは、上記抗菌性ペプチドの両者が少くとも一つの植物病原体に対して活性である。

本発明のこのより好ましい態様に従い、少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが植物病原性バクテリアに対して比較的活性であり、かつ植物病原性真菌に対して比較的の不活性であり、少くとも一つの第二の抗菌性ペプチドが植物病原性真菌に対して比較的活性であり、かつ植物病原性バクテリアに対して比較的の不活性である。本発明のこの面に従い、それから少くとも一つの第一の抗菌性ペプチドが選択されうるところの代表的ペプチドは下記を包含する。(SEQ ID No. 6) ; (SEQ ID No. 3) ここで  $Xaa^5$  は Phe、 $Xaa^6$  は Leu、 $Xaa^7$  は His、 $Xaa^8$  は Ser、 $Xaa^{10}$  は Lys、 $Xaa^{11}$  は Lys、 $Xaa^{12}$  は Phe、 $Xaa^{13}$  は Ala、 $Xaa^{18}$  は Ala、 $Xaa^{19}$  は Ile、 $Xaa^{21}$  は Met、 $Xaa^{22}$  は Asn、そして  $Xaa^{23}$  は Ser である ; (SEQ ID No. 3) ここで  $Xaa^5$  は Asn、 $Xaa^6$  は Leu、 $Xaa^7$  は His、 $Xaa^8$  は Ser、 $Xaa^{10}$  は Lys、 $Xaa^{11}$  は Lys、 $Xaa^{12}$  は Phe、 $Xaa^{13}$  は Ala、 $Xaa^{18}$  は Ala、 $Xaa^{19}$  は Ile、 $Xaa^{21}$  は Met、 $Xaa^{22}$  は Asn、そして  $Xaa^{23}$  は Ser であり、N 末端

10

20

30

40

50

Glyにペプチド結合されたMetを持つ；(SEQ ID No. 2)にペプチド結合された(SEQ ID No. 2)；(SEQ ID No. 5)のブリッジにペプチド結合された(SEQ ID No. 2)、ここでブリッジは構造(SEQ ID No. 2)の別のペプチドに結合されている；(SEQ ID No. 3)、ここでXaa<sup>5</sup>はPhe、Xaa<sup>6</sup>はLeu、Xaa<sup>7</sup>はHis、Xaa<sup>8</sup>はSer、Xaa<sup>10</sup>はLys、Ser<sup>11</sup>はLys、Xaa<sup>12</sup>はPhe、Xaa<sup>13</sup>はAla、Xaa<sup>18</sup>はAla、Xaa<sup>19</sup>はGlu、Xaa<sup>21</sup>はMet、Xaa<sup>22</sup>はAsnそしてXaa<sup>23</sup>はSerである；それにペプチド結合されたN末端Metを更に含む直上で述べたAMPPP、及び同じマガイニン1置換誘導体。

上記少くとも一の第二の抗菌性ペプチドは、(SEQ ID No. 1)、(SEQ ID No. 2)、N末端Glyにペプチド結合されたMetを持つ(SEQ ID No. 2)、位置21のMetが酸化されている(SEQ ID No. 2)、位置21のMetが除去されている(SEQ ID No. 1)、N末端Glyが除去されかつ位置2のIleがMetで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置10のLysがHisで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置11のLysがHisで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置10及び11のLysが夫々His及びHisで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置8のSerがThrで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置8のSerがAlaで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、位置7のHisがPheで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、夫々位置22及び23のAsn及びSerが除去されている(SEQ ID No. 2)、位置10のGlyがHisで置き換えられている(SEQ ID No. 1)、N末端Glyが除去されている(SEQ ID No. 2)、N末端Gly及び位置2のIleが除去されている(SEQ ID No. 2)、N末端Gly及び位置2のIleが除去されている(SEQ ID No. 1)、N末端Glyが除去されている(SEQ ID No. 1)、N末端Glyにペプチド結合されたMetを有する(SEQ ID No. 1)、C末端Serが除去されている(SEQ ID No. 1)、C末端Ser及び位置22のLysが除去されている(SEQ ID No. 1)、位置22のAsnがGlyで置き換えられている(SEQ ID No. 2)、C末端Serが除去され、位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する(SEQ ID No. 1)、及び位置7のHisがArgで置き換えられ、位置8のSerがGluで置き換えられ、位置23のSerがProで置き換えられ、かつN末端Glyにペプチド結合されたMetを有する(SEQ ID No. 1) (つまり(SEQ ID No. 20)から成る群から選択される。

もちろん、本発明の抗菌性組成物が二つのみの相補的抗菌性ペプチドの使用に限定される必要はない。たとえば、植物病原性バクテリアに対して高度に活性P1は、他の二つのAMPPPと組み合わせることができ、その各々は別の群の植物病原性真菌に対して活性である。得られた三成分混合物は従って、いずれか一つのペプチド単独よりもはるかに広いスペクトルの保護を与える。

このように追加的な利益が、相補的混合物における3つ以上の抗菌性ペプチドの使用から得られる。たとえば、混合物に第3の抗菌性混合物を加えることができ、これは混合物中の他二成分のペプチドの一つと幾分類似の植物病原体に対する活性範囲を持ち、しかし、他二成分ペプチドのいずれよりも植物毒性が極めて低く又は蛋白分解的減成に対して極めて抵抗性でありうる。得られる混合物は、従って、夫々の個々の成分の利点を共有している。

本発明の好ましい混合物は、下記の混合物を包含する。

(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 1)；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 10)；(SEQ ID NO. 6) プラス Met - (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は Arg、Xaa<sup>8</sup> は Glu、Xaa<sup>10</sup> は Gly、

$Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、 $Xaa^{2\ 2}$  はLys、そして $Xaa^{2\ 3}$  はPro；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMetであり、 $Xaa^{2\ 2}$  及び $Xaa^{2\ 3}$  は除去されている；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はLys、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMetであり、 $Xaa^{2\ 2}$  及び $Xaa^{2\ 3}$  は除去されている；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMetそして $Xaa^{2\ 2}$  はLysかつ $Xaa^{2\ 3}$  はSer；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はLys、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、そして $Xaa^{2\ 2}$  はAsnかつ $Xaa^{2\ 3}$  はSer；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、そして $Xaa^{2\ 2}$  はAsnかつ $Xaa^{2\ 3}$  はSer；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、そして $Xaa^{2\ 2}$  はLysかつ $Xaa^{2\ 3}$  はSer；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7)；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 1)；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 10)；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラスMet - (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はArg、 $Xaa^8$  はGlu、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、 $Xaa^{2\ 2}$  はLys、そして $Xaa^{2\ 3}$  はPro；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMetであり、そして $Xaa^{2\ 2}$  及び $Xaa^{2\ 3}$  は除去されている；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis、 $Xaa^8$  はSer、 $Xaa^{1\ 0}$  はGly、 $Xaa^{1\ 1}$  はLys、 $Xaa^{1\ 2}$  はPhe、 $Xaa^{1\ 3}$  はGly、 $Xaa^{1\ 8}$  はGly、 $Xaa^{1\ 9}$  はGlu、 $Xaa^{2\ 1}$  はMet、そして $Xaa^{2\ 2}$  はLysかつ $Xaa^{2\ 3}$  はSer；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) について $Xaa^5$  はPhe、 $Xaa^6$  はLeu、 $Xaa^7$  はHis

、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はLys、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、そしてXaa<sup>a22</sup>はAsnかつXaa<sup>a23</sup>はSer；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はAsn、そしてXaa<sup>a23</sup>はSer；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a1</sup>は除去され、Xaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はLys、そしてXaa<sup>a23</sup>はSer；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 7)；(SEQ ID NO. 6) プラスMet - (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 1) ここで (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はArg、Xaa<sup>a8</sup>はGlu、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はLys、そしてXaa<sup>a23</sup>はPro；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 10) ここで (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はPhe、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はLys、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はAsn、そしてXaa<sup>a23</sup>はSer；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラス (SEQ ID NO. 1)；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラス (SEQ ID NO. 2)；(SEQ ID NO. 6) プラス (SEQ ID NO. 7) プラスMet - (SEQ ID NO. 3)；ここで (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>は：Leu、Xaa<sup>a7</sup>はArg、Xaa<sup>a8</sup>はGlu、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はLys、そしてXaa<sup>a23</sup>はPro；(SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 2) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで初めの (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a1</sup>及びXaa<sup>a2</sup>は除去され、Xaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はLys、そしてXaa<sup>a23</sup>はSerであり、二つめの (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>は：Lys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、そしてXaa<sup>a22</sup>及びXaa<sup>a23</sup>は除去されている；(SEQ ID NO. 10) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで初めの (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a1</sup>及びXaa<sup>a2</sup>は除去され、Xaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>はLys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMet、Xaa<sup>a22</sup>はLys、そしてXaa<sup>a23</sup>はSerであり、二つめの (SEQ ID NO. 3) についてXaa<sup>a5</sup>はPhe、Xaa<sup>a6</sup>はLeu、Xaa<sup>a7</sup>はHis、Xaa<sup>a8</sup>はSer、Xaa<sup>a10</sup>はGly、Xaa<sup>a11</sup>は：Lys、Xaa<sup>a12</sup>はPhe、Xaa<sup>a13</sup>はGly、Xaa<sup>a18</sup>はGly、Xaa<sup>a19</sup>はGlu、Xaa<sup>a21</sup>はMetそしてXaa<sup>a22</sup>及びXaa<sup>a23</sup>は除去されている；Met - (SEQ ID N

O. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) プラス (SEQ ID NO. 3) ここで初めの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Gly、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Ala、Xaa<sup>18</sup> は Ala、Xaa<sup>19</sup> は Glu、Xaa<sup>21</sup> は Met、Xaa<sup>22</sup> は Lys、そして Xaa<sup>23</sup> は Ser であり、二つめの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>1</sup> 及び Xaa<sup>2</sup> は除去され、Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Gly、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Gly、Xaa<sup>18</sup> は Gly、Xaa<sup>19</sup> は Glu、Xaa<sup>21</sup> は Met、Xaa<sup>22</sup> は Lys、そして Xaa<sup>23</sup> は Ser であり、三つめの (SEQ ID NO. 3) について Xaa<sup>5</sup> は Phe、Xaa<sup>6</sup> は Leu、Xaa<sup>7</sup> は His、Xaa<sup>8</sup> は Ser、Xaa<sup>10</sup> は Gly、Xaa<sup>11</sup> は Lys、Xaa<sup>12</sup> は Phe、Xaa<sup>13</sup> は Gly、Xaa<sup>18</sup> は Gly、Xaa<sup>19</sup> は Glu、Xaa<sup>21</sup> は Met、そして Xaa<sup>22</sup> 及び Xaa<sup>23</sup> は除去されている；等々。

上記のペプチドに加えて、本発明の相補的混合物は更に、担体、希釈剤、保存剤、緩衝剤などを含むことができる。これは、緩衝剤たとえばトリス（トリスー〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン）；MES（2-〔N-モルホルル〕エタンスルホン酸）；及びHEPES（N-〔2-ヒドロキシエチル〕ピペラジン-N-〔2-エタンスルホン酸〕、及び保存剤たとえばアシドナトリウム又はチメロサルを包含する。これら添加物の混合物もまた、有用でありうる。用いられる場合、これら添加物は一般に、約0.01～約10%（w/v）の量で存在する。

本発明の相補的混合物で用いられるペプチドは、本明細書記載の化学的又は遺伝子方法で作ることができる。そして、これらのペプチドは集められ、適当な比で混合され、従って、本発明のRAMP PP及びオリゴペプチドが提供するのとはほぼ同じ方法で、植物又は他の生物に保護を与える。また、これら混合物は、たとえば上記したP1及び〔Arg7〕Mag1の共存を許すことによって遺伝子的に作ることができる。得られる表現されたペプチドは、従って、本発明の相補的混合物をインサイツに形成する。そのようなインサイツ形成は、細胞の内部小室内で実現でき、又は、ペプチドが細胞間の細胞外空間に個々に排せつされた後に実現できた。

また、該混合物は、たとえばP1のペプチドモノマーのC末端が、N末端にHisそしてC末端にSerを持つ二つのアミノ酸から成るペプチドブリッジのN末端に結合され、ブリッジのC末端がたとえば上述のマガイニン1の単一残基置換誘導体のN末端Glyに結合されているところのブリッジされた二量体オリゴペプチドの作成により、作ることができた。本発明者は、活性であり、His-Ser結合を認識し、この間の結合を切る植物プロテアーゼが存在することを確認した。すなわち、得られたオリゴペプチドが細胞から排せつされるとき、細胞外プロテアーゼが二つのペプチドを開裂して、P1の単一残基C末端付加誘導体（His）と上記置換されたペプチドの単一残基N末端付加誘導体（Ser）の相補的混合物をもたらすであろう。この例において、少なくとも一つの第一のペプチドP1は、そのN末端に付着されたMet又は（f）Metを更に持つことができる。従って、得られるペプチドは、P1の単一残基N末端及び単一残基C末端付加誘導体である。

ペプチド、ペプチドモノマー（反転ペプチドを含め）、及びオリゴペプチドの化学的合成法

本発明に従う抗菌性ペプチド（AMP PPを含め）、反転ペプチドならびにオリゴペプチド、ブリッジ及びペプチドモノマーは、伝統的な化学的合成により、又は一以上のペプチド、ブリッジ及び／又はフラグメントを遺伝子的にエンコードする特定のDNA物質をホスト細胞に挿入し、この細胞に望むペプチドを表現させる一以上の方法により、有利に作ることができる。

伝統的な化学的合成については、本発明に従う抗菌性ペプチド、反転ペプチド、ブリッジ及びオリゴペプチドは、いずれかの公知のペプチド合成手順、たとえば「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」Volume



2- "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", E. GrossおよびJ. Meienhofer編 Academic Press, New York, 1980, 及びVolume 9-「Special Methods in Peptide Synthesis, Part C」S. Udenfriend及びJ. Meienhofer編, Academic Press, San Diego, 1987に記載された方法を用いて合成できる。

ペプチドの化学合成のために本発明で好ましく用いられるのは、固相法である。なぜなら、これは、高度に純粋なペプチドの迅速な合成を可能にするからである。そのような手順において、ペプチドのC末端から出発して、不溶性ポリマー支持体（樹脂と呼ばれる）上で、好ましくは一度に一つのアミノ酸で、ペプチドが合成される。ペプチドのC末端アミノ酸（CTAA）を樹脂に、化学的結合基たとえばアミド又はエステルを介して付着することにより合成は始められる。もしエステルとして樹脂に結合されるのなら、得られるペプチドはC末端カルボン酸であり、アミドとして結合されるのなら、得られるペプチドはC末端アミドである。ペプチド合成に用いられるCTAAならびに他の総てのアミノ酸は、そのアルファアミノ基及び側鎖官能基（もしあれば）を、合成の間に選択的に除去（脱保護）されうる誘導体として差別的に保護されねばならない。合成（カップリング）は、アミノ酸の活性化された（たとえば、その対称的無水物又は活性エステル）を、樹脂に付着されたN末端アミノ酸のブロックされていないアルファアミノ基と反応させることにより実施される。そのようなアルファアミノ基の脱保護及び続くカップリングの手順を、望むペプチド鎖が構築されるまで繰返す。次に、ペプチド中に存在する官能基の総てを脱保護し、通常スカベンジャーと呼ばれる化合物（このプロセスの間にペプチドとの副反応を禁止する）の存在下で、樹脂から開裂する。次に、得たペプチドを、種々の方法たとえばゲル濾過、イオン交換及び高速液体クロマトグラフィ（HPLC）により精製する。開裂及び精製のプロセスの間に、N末端に存在するアミノ基に又はペプチドのリシン（Lys）、アルギニン（Arg）、ヒスチジン（His）又はオルニチン（Orn）に結合された多数の酸塩形のいずれに転化されるかも知れず、従って、得られる純粋なペプチドは通常、そのような塩の形で得られる。下記に記載されているメリフィールド型の固相法が本発明で好ましく用いられる。G. バラニイ（Barany）とR. B. メリフィールド（Merrifield）、「Solid-Phase Peptide Synthesis」The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Volume 2, Ch. 1, pp 3-284; 及びJ. M. StewartとJ. D. Young, 「Solid-Phase Peptide Synthesis, 第2版」Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., 1984。一般に、任意の標準的側鎖基保護手法を有利に用いるが、t-Boc（tert-ブチルオキシカルボニル；たとえば、バラニイとメリフィールド、及びスチュワートとヤング、前出）及びFMOC（9-フルオレニルメトキシカルボニル、たとえばE. アーサートンとR. C. シェバード、「The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group」、前出、第9巻、第1章、第1-38頁）の手法が好ましい。

C末端カルボン酸を含むペプチドの先駆体として必要なペプチド樹脂の合成は、典型的には、市販入手できる架橋ポリスチレン又はポリアミドポリマー樹脂、たとえばクロロメチル、ヒドロキシメチル、アミノメチル、PAM（フェニルアセトアミドメチル）、HMP（p-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸）、p-ベンゾイルオキシベンジルアルコール、Hycram（4-プロモクロトニル-β-アラニルアミドメチル）；Advanced Chemtech社、ルイーズビル、KY）、又はSasrin（2-メトキシ-4-アルコキシベンジル）アルコール；Bachem Bioscience社、フィラデルフィア、PA）上で始められる。アミノ酸のカップリングは、たとえばDCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）、HOBT（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール）から作られる対称無水物、又はたとえばDCC/HOBTから又はたとえば種々のBOP剤〔たとえばJ. コステ（Coste）ら「BOP and Congeners: Present 50

t Status and New Developments", Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium; Peptides: Chemistry, Structure and Biology, J. E. RivierとG. R. Marshall、編、ESCOM, Leiden. Neith., 1990、pp885-888を参照)から作られた活性エステルを、溶剤たとえばDCM (ジクロロメタン)、DCM含有TFE (トリフルオロエタノール)、DMF (N, N-ジメチルホルムアミド)、NMP (N-メチルピロリドン) 又はNMP含有DMSO (ジメチルスルホキシド) 中で用いることによって達成できる。

本発明で好ましく用いられるのは、DMF又はDMF/DCM溶液中でPAM樹脂上での、t-Boc保護されたアミノ酸〔但し、アルギニン (Arg)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) 及びヒスチジン (His) を除く。これらは、好ましくはDCC/HOBTから作られたHOBT活性エステルとしてカップリングされる〕、及びNMP溶液中でHMP-ポリスチレン樹脂上での、FMOC保護されたアミノ酸のDCC/HOBT製造のHOBT活性エステルのカップリングである。

本発明でより好ましいのは、初めに1.9ミリモルのDIEA/0.5ミリモルのPAM樹脂を含むNMP中で、次にNMP/DMSOの80/20溶液中で、最後にNMP/DMSOの80/20溶液中でPAM樹脂へのt-Boc保護されたアミノ酸のDCC/HOBT製造のHOBT活性エステルのカップリングである。

C末端アミドを含むペプチドへの先駆体としてのペプチド樹脂の合成は、上述の手順を用いて満足に行える。しかし、ベンズヒドリルアミン (BHA) 又は4-メチルベンズヒドリルアミン (MBHA) ポリスチレン樹脂のようなポリマー支持体を用いなければならない。本発明のこの面、すなわちC末端に結合されたアミド基を持つAMP PPの製造において、4-メチルベンズヒドリルアミン-ポリスチレン樹脂が好ましく用いられる。

多くのタイプの側鎖保護基が、たとえば、バラニイとメリフィールド (前出)、グロスとメインホファー編「The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology」Volume 3- "Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis", Academic Press, New York, 1981. およびスチュワートとヤング (前出) によりt-Bocアミノ酸について記載されたように、またアサートンとシェパード (前出) によりFMOCアミノ酸について記載されたように、t-Boc又はFMOC固相合成のために用いられうる。

t-Bocアミノ酸のために本発明で好ましいのは、アルギニンのためのMTS (メシチレン-2-スルホニル)、アスパラギン酸のためのOBzl (ベンジルエステル)、システインのための4-Me Bzl (4-メチルベンジルチオエーテル)、3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニンのためのBzl2 (ジベンジルジエーテル)、グルタミン酸のためのOBzl、ヒスチジンのためのBom (ベンジルオキシメチル) 又はZ (ベンジルオキシカルボニル)、3-及び4-ヒドロキシプロリンのためのBzl、リシン及びオルニチンのためのC1-Z (2-クロルベンジルオキシカルボニル)、セリン及びスレオニンのためのBzl、トリプトファンのためのCHO (ホルミル)、チロシンのためのBr-Z (2-ブロムベンジルオキシカルボニル) である。メチオニンは、そのスルホキシドとして〔Met (0)〕保護されうるが、好ましくは保護されずに用いられる。

本発明に従うAMP PP、RAM PP、RAM PP、オリゴペプチド及びブリッジを含むペプチドは、自動化装置で又は人の手による方法で合成できる。しかし、自動化法が好ましい。本発明で述べられるAMP PPの例の総ては、Applied Biosystems (ABI) 社のModel 430A自動化ペプチド合成機を用いて、そのユーザーマニュアル、バージョン1.30、セクション6、Applied Biosystems、フォスター市、CA、1987年2月 (1987年11月及び1988年10月改訂) 記載のt-Bocプロトコルを用いて実際に作られた。

これらプロトコルに従い、ペプチドは、ペプチドのC末端から出発して樹脂で組立てら

れる。C末端カルボン酸の合成のために必要なPAM又はHMP樹脂は、ABI又は他の製造者から購入でき、 $\alpha$ -アミノ酸及び側鎖保護されたC末端アミノ基に既に結合されている。しかし、C末端カルボキシアミドを作るとき、C末端アミノ酸は初めにBHA又はMBHA樹脂にカップリングされねばならない。いずれの場合でも、 $\alpha$ -アミノ酸及び側鎖保護されたC末端アミノ酸を含む樹脂は反応容器に入れられ、ペプチド鎖は、樹脂に付着されたN末端アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の脱保護及びこれに次のアミノ酸（これも $\alpha$ -アミノ及び側鎖保護されている）へのカップリングの繰返しによって、一度に好ましく組立てられる（ペプチドのフラグメントの組立は可能であるが、本発明のAMP PPのために通常あまり好ましくない）。

N末端アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基の脱保護及び次の保護されたアミノ酸のカップリングの順は、望むペプチド鎖が組立てられるまで続けられる。ポリマー支持体に結合された、得られたN末端及び側鎖保護されたペプチドは次に、適当な脱、保護及び開裂手順に付されて、通常、N末端及びリシン、ヒスチジン、アルギニン及びオルニチン酸塩として、保護されていないペプチドを与える。

合成は、カップリング段階において0.5ミリモルのC末端アミノ酸樹脂及び2.0ミリモルの側鎖保護されたt-Bocアミノ酸から出発して、t-Boc保護戦略を用いて実施された。しかし、これらの量は重要でなく、用いる自動化装置又はマニュアルの道具のタイプに依存して、比例してより大きな又は小さな量を用いる。たとえば、0.1ミリモルのような少量及び0.6ミリモルのような大量のアミノ酸-PAM樹脂を用いる合成を、ABI装置を用いて本発明者は行った。この装置を用いるとき、カップリングされるべきアミノ酸対PAM樹脂に付着されたアミノ酸又はペプチドのモル比は4が好ましいけれど、より大きい又は小さい比も用いる。3.33のような小さな比（0.6ミリモルのPAM樹脂/2.0ミリモルのアミノ酸）が、カップリング効率の何ら重大な低下なしに用いられた。一回当たり作られるペプチドの量を増すために、より低い比を用いるが、カップリング効率、従ってペプチド純度が低るので、あまり好ましくない。より大きな比は、もはや効率的でないので、一般に好ましくない。

DMF中でのt-Boc保護手法に基づく合成において、 $\alpha$ -アミノ基の脱保護は、TFA/DCMを用い、次にDIEA/DMFでの中和により、環境温度で行われる。対称的な無水物はDCM中でDCCから形成される。但し、ロイシン、メチオニン、スルホキド、トリプトファン及びホルミルトリプトファンはDCM中の10% DMF中で形成される。副生成物DCU（N,N-ジシクロヘキシルウレア）の濾過後、DCMは酸化され、DMFで置き換えられ、この間温度は10~15℃に維持される。この手順を用いて合成されるAMP PPのために、成長するペプチド鎖の長さが9のアミノ酸を越えた後、ダブルカップリングされる。これらの場合、濾過後のDCM溶液は、次の段階で直接用いられる。HOBT活性なエステルは、アスパラギン、グルタミン及び保護されたヒスチジンについては8-10% v/v DCMを含むHOBTとDCCとの反応から、及びアルギニン（MTS）については25-30% v/v DCMを含むHOBTとDCCとの反応から形成される。副生成物DCUの濾過後に、HOBT活性エステル溶液は、DCMの除去なしに次の段階で直接用いられる。これら4つのアミノ酸は常に、同じ手順を用いてダブルカップリングされる。

適当な溶剤中でアミノ酸対称無水物又はHOBT活性エステルが形成されると、溶液は反応容器に移され、N末端 $\alpha$ -アミノ脱保護されたペプチド樹脂と共に振り動かされる。この間にカップリングが起り、これは当初、対称無水物については18~26分間、活性エステルについては26~42分間である。ペプチド鎖が長くなると、カップリング時間は一般に増大される。たとえば15のアミノ酸後には10分間が追加される。カップリングは当初、対無水物が形成される温度で行われるが、カップリング期間の間に徐々に環境温度に達する。カップリング期間の完了時に、樹脂をDCMで洗い、ニンヒドリン検出のためにサンプルを取り〔サリン（Sarin）ら、"Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction," Anal. Biochem.

117, (1981), 147-157 参照]、そして次のカップリングサイクルの準備のために乾燥させる。

NMP中でのt-Boc保護手法に基づく合成において、 $\alpha$ -アミノ基の脱保護は上記のように行われるが、但し、過剰のTFAの中和は、DIEA/DCM、DIEA/NMP、及びNMP単独での洗浄により行われる。DCC、HOBT及びN-末端及び側鎖保護されたアミノ酸の各1.0当量をNMP中で環境温度で約40~60分間反応させることによって総てのアミノ酸はHOBT活性エステルへと転化される。副生DCUの濾過後、HOBT活性エステル溶液は、カップリング反応で直接用いられる。カップリングは環境温度でDMP中で30分間、DMSOのNMP中の20:80溶液を与えるべく十分なDMSOを加えてから更に16分間、そして最後に、1.9ミリモルのDIEAの添加後に更に7分間行われる。ペプチド鎖が長くなるにつれて、より長いカップリング時間が用いられる。たとえば、ペプチド鎖が15のアミノ酸に達した後は、カップリング時間は15分間延長される。ダブルカップルサイクルは、シングルカップルサイクルと同じように行われるが、Lys<sup>4</sup>又はAMPPPにおける均等物のためにのみ一般に用いられた。カップリングサイクルの完了時に、ペプチド樹脂上に残る未反応のアミノ基は、これを、DCM中の10%無水酢酸及び5%DIEAの溶液で5分間処理し、次にDCM中の10%無水酢酸と4分間振とうすることによってキャップされる。DCMでよく洗った後に、樹脂のサンプルを、上記のようにカップリング効率のニンヒドリン検出のために採り、そして次のカップリングサイクルの準備のために乾燥する。DMF又はNMPを用いてカップリング効率は常に98%より大きく、殆どの場合99%より大きかった。

AMPPP、オリゴペプチド、フラグメント、逆ペプチドおよびフラグメントを含む本発明のペプチドはここに記載されかつABIモデル430Aペプチド合成装置として入手できるFMOC化学により上首尾で合成できる[K. H. オットソン (Otterson) "NMP化学に関する最近の進展 (Recent Developments with NMP Chemistry) の"タンパク化学は芸術か科学か? (Is Protein Chemistry an Art or a Science) "アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems), FASEBミーティング、ニューオルレアズ、1989年4月]。また、S. ノザキ (Nozaki) は、"連続流動条件下でのマガイニン1の固相合成 (Solid Phase Synthesis of Magainin 1 Under Continuous Flow Conditions)" Chem. Lett., 1989, pp. 749-752において、HMP樹脂を使用し、ここに記載のものと極めて類似する自動化FMOC法を用いてマガイニン1を合成する方法を詳細に記載している。

ここに記載するペプチドすべては別々に調製されるが、多数のペプチドを同時に調製することもしばしば望ましく、かつ当を得たものである。このような合成を実施する手順は文献で周知であり、このような仕事を行うための市販の装置も入手できる。例えば、クエルボ (Cuervo) 等の上記文献の"マガイニン類：高い抗生物活性および低い溶血活性に係る配列因子 (The Magainins: Sequence Factors Relevant to Increased Antimicrobial Activity and Decreased Hemolytic Activity) および上記文献の"マガイニンのアラニン置換類似体の合成および抗生物活性 (Synthesis and Antimicrobial Activity of Nagainin Alanine Substitution Analogues)"においてC-末端アミドをもつ省略およびアラニン置換類似体並びにマガイニン1および2のカルボン酸の、PAMおよび4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂両者上のt-Boc保護アミノ酸を用いるSMPS (同時の多数のペプチドの合成 (Simultaneous multiple peptides Synthesis) 法) を利用した同時合成を報告している。また、F. S. ツヨング (Tjoeng) 等は"単一の支持体を用いた多数のペプチドの合成 (Multiple Peptide Synthesis Using a Single Support (MPS3))", Int. J. Peptide P

rotein Res., 1990, 35, pp. 141-146において、*t*-Boc 保護アミノ酸およびPAM樹脂を用いた、21-位において種々のアミノ酸で置換されたマガイニン2の類似体の同時合成を報告している。しかし、同じ論文においてこれらの著者は、この方法がブタアンジオテンシノーゲンペプチドの11-置換類似体の同時合成について、ABIモデル430Aペプチド合成装置を用いて自動化できることを示した。

上記論文に記載されたものと同様な手順が特に本発明の実施のために利用できる。これに従えば、好ましい方法では、3種のマガイニン置換類似体の同時合成のために、*t*-Bocアミノ酸、PAM樹脂、およびDCC/HOBTカップリング(NMP-NMP/DMSO中)が利用できた。多数の置換類似体が同時にカップリングできるが、生成したペプチドの分離はより困難になり、かつ生成した各ペプチドの収量は減少する。

10

本発明の実施に際して、多くの共通なセグメントを含む種々のペプチド部分を同時に合成することが可能である。例えば、置換のためにC-末端のみが異なるペプチドまたは鎖長のみ異なるペプチドは、異なるC-末端配列を含むPAM樹脂と一緒に混合し、次いで同時に周期的に共通のアミノ酸セグメントを通常の方法で該樹脂混合物にカップリングすることにより同時に合成できる。このために、好ましい方法では、PAM樹脂上で*t*-Bocアミノ酸を用い、NMPまたはNMP/DMSO中でのDCC/HOBTを利用して生成したHOBT活性エステルを使用する。

同様に、主としてN-末端の異なるペプチドの多数のセグメントを、まず共通のC-末端鎖を含むペプチド-PAM樹脂を、該N-末端における初めて異なるアミノ酸に至るまで調製することにより、同時に合成できる。次いで、このペプチド-樹脂を別々の容器に分割し、各ペプチド合成を別々に続ける。2種の生成したペプチド-樹脂をカップリングして完成するか、あるいは更にペプチド合成の後の段階で、他の所定の分岐部分に達した時点で分割する。本発明の範囲内の多数ペプチド合成で使用するのに好ましいのは、NMPまたはNMP/DMSO中でのDCC/HOBTカップリングを利用したPAM樹脂上での*t*-Bocプロトコルである。生成するペプチド-樹脂の量を増すために、標準的な0.5 mMよりもむしろ0.6 mMの樹脂を、多数ペプチドの合成でカップリング効率を損うことなく利用できる。

20

C-末端カルボン酸またはアミノ酸ペプチド用の先駆体として得たペプチドは、文献に記載されている周知の任意の標準的方法(例えば、バラニー(Barany)およびマリフィールド(Marrifield)の上記文献、スチュアート(Stewart)等の上記文献、J. P. タム(Tam) & R. B. マリフィールド(Marrifield)の“合成ペプチドの強酸脱保護：機構と方法(Strong Acid Deprotection of Synthetic Peptides: Mechanisms and Methods),” (“ペプチド・分析、合成、バイオロジー(The Peptides Analysis, Synthesis, Biology),” vol. 9, 第5章, pp. 185-248)およびアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems), “ペプチド合成における戦略-開裂法の基礎(Strategies in Peptide Synthesis-Introduction to Cleavage Techniques),” 1990, アプライドバイオシステムズを参照のこと)を利用して、該樹脂から開裂および脱保護できる。例えば、*t*-Bocペプチド-樹脂についていえば、これらは標準無水HF(弗化水素)、低/高HF、TFMSA(トリフルオロメタンスルホン酸)およびTMSOTf(トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート)を含む。しかし、標準HFおよび低/高HF法は、*t*-Bocペプチド-樹脂からの脱保護および開裂のために本発明で使用するのに好ましい。また、N-末端*t*-Boc保護基は、該ペプチドをHF脱保護および開裂する前に除去することが好ましい。

30

40

標準的な無水HF条件を用いた*t*-Boc-ペプチド-PAMの開裂および脱保護は、一般に上に挙げた参考文献に与えられている方法に従って行われる。典型的には、約1 gの該ペプチド-樹脂を、1.0 mlのアニソール、0.4 mlのジメチルスルフィド(DMS)、0.2~0.4 mlの1, 2-エタンジチオールおよび3 mgの2-メルカプトピ

50

リジンをスキヤベンジャーとして含む10～12mlの無水HF溶液中で、-5℃～0℃にて約50～90分攪拌する。存在するスキヤベンジャーの量のわずかな変動は結果に大きな影響を与えず、また上で引用した文献中に記載されたような他のスキヤベンジャーを使用してもよい（例えば、トリプトファンを含むペプチドでは3mgのスカトールをも添加すべきである）。しかし、上に特定した反応時間および温度を用いることが好ましい。というのは、短い反応時間および低い反応温度は不完全な脱保護および開裂をもたらす可能性があり、一方高い反応温度は副反応を生ずる恐れがある。長い反応時間は一般に望ましくなく、副反応を起こす恐れがあるが、いくつかの場合には、例えばトシル基で保護されたアルギニンまたは数個のアルギニンが該ペプチド鎖中に存在する場合、より完全な脱保護のためには2時間までの反応時間が必要とされる可能性がある。このHF法を実施するの

10

のに特に好ましい方法は、イムノダイナミックス社（Immuno-Dynamics Inc.）（カリフォルニア州、ラジョラ）の方法である。この方法では、HF/スキヤベンジャー/ペプチド-樹脂混合物を先ず-10℃にて30分間攪拌し、次いで0℃にて30分（0℃にてアルギニン1個当たり5分以上）攪拌する。該“低/高（low/high）”無水HF法は、メチオニンのアルキル化などの副反応を最小化するために、本発明に記載の任意のペプチド-樹脂の脱保護および開裂に使用できるが、複数のペプチドの同時合成で生成したペプチド-樹脂混合物の脱保護および開裂のために特に好ましい。これに続く好ましい手順は基本的にはJ. P. タム（Tam）等の“ジメチルスルフィド中での低濃度HFによる合成ペプチドのSH<sub>2</sub>脱保護：ペプチド合成における検証および応用（SN<sub>2</sub> Deprotection of Synthetic Peptides with a Low Concentration of HF in Dimethyl Sulfide: Evidence and Application in Peptide Synthesis）”，J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, pp. 6442-6455およびタムおよびメリフィールドの上記文献における“合成ペプチドの強酸による脱保護：機構および方法（Strong Acid Deprotection of Synthetic Peptides: Mechanisms and Methods）”に記載のものであり、これらは2.5:6.5:1の無水HF/ジメチルスルフィド/p-クレゾール10～20ml（好ましくは10～12ml）中に約1gのペプチド-樹脂を含む溶液を-5℃～0℃にて約2時間攪拌（該ペプチド-樹脂がTrp（For）を含む場合には、次いで10:26:3:1の無水HF/ジメチルスルフィド/p-クレゾール/チオクレゾールの溶液を代りに使用する）する。次に、HFとDMSとを約-5℃～0℃にて真空下で除去し、新たに無水HFを添加する。次いで、“高”または“標準”開裂を、-5℃～0℃にて更に45～90分間該混合物を攪拌することにより行う。この“高”HF脱保護を行うのにより好ましい方法はイムノダイナミックス社の方法である。この方法において、1mlのアニソール、0.4mlのDMS、0.4mlの1, 2-エタンジチオールおよび3mgの2-メルカプトピリジンを10mlの新たな無水HFと共に添加して、この混合物を-10℃にて30分、0℃にて30分（0℃にてアルギニン1個当たり5分以上）攪拌する。

20

30

該“標準”または“低/高”HF脱保護および開裂法のいずれかの完了後、HFおよび任意の残留DMSを-5～0℃にて真空下で完全に蒸発させる。次に、得られるペプチド-樹脂-スキヤベンジャー混合物を約10～15mlのジエチルエーテル、酢酸エチルなど（体積に制限はなく、ジエチルエーテルが好ましい）と混合し、濾過し、残渣を2～4回10～15mlのジエチルエーテル、酢酸エチルなど（体積は制限されず、ジエチルエーテルが好ましい）で洗浄して有機スキヤベンジャーを除去する。この時点で、5mlの2-メルカプトエタノール（BME）と共に30分該残渣を攪拌して、メチオニンスルホキシドをメチオニンに還元することが好ましい。次に、このペプチドを2%のBME含有10～30%酢酸5～30mlで3回抽出し、この抽出液を併合し、（必要ならば）水で希釈して酢酸の最終濃度を10%以下とし、次いで凍結乾燥する。得られる粗製ペプチドの重量は典型的には約50～90%の範囲にある。

40

50



“低-高” HF 開裂および脱保護の完了後、該ペプチドの好ましい抽出法はイムノダイナミックス社の使用した方法である。この方法においては、HFとDMSの蒸発後、該ペプチド/樹脂混合物をクロロホルムで膨潤後、3回10mlのエーテルで洗浄し、5mlのBMEと共に20~30分攪拌する。次に、この混合物を3回5~30mlの1:1の10~30%酢酸/BMEで抽出した（しばしば、0.1%のTFA含有50%水性アセトニトリル20~30mlで更に抽出することが有利である）。次に、抽出物を併合し、20mlのエーテルで3回抽出して残留するスクヤベンジャーを除去し、ペプチドを該水性酢酸/（アセトニトリル）/BME層の凍結乾燥により回収する。

このHF脱保護、開裂法から得た粗製ペプチドはN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチン弗化水素酸塩として存在し、また他の弗化物塩およびスクヤベンジャーで汚染されている可能性もある（他の脱保護スキームを用いた場合には、例えばトリフルオロメタンスルホン酸を用いた場合には、他の無機塩、例えばトリフルオロメタンスルホネートが代りに存在するであろう）。このようなペプチドまたは無機塩は望ましくない。というのは、これら単独もしくは水分の存在下では、これらは強酸として作用する恐れがあり、該ペプチドを分解もしくは植物に対して有害である可能性がある。従って、更に精製してこのような塩を除去することが好ましく、これにより単位重量当たり高活性のペプチドを得ることも可能となる。このペプチドを精製する好ましい方法はアニオン交換クロマトグラフィーにより弗化物塩を除去し、次いでHPLC（高速液体クロマトグラフィー）により単離することである。

本発明の実施に際して典型的に好ましい如く、アニオン交換クロマトグラフィーは該ペプチドを酢酸塩として与え、一方HPLCは該ペプチドをトリフルオロ酢酸塩として与える。

イオン交換クロマトグラフィーを実施する典型的な方法は該粗製ペプチドを最小量の5~30%酢酸（より高い酢酸濃度がより疎水性の高いペプチドに対して必要とされる）に溶解し、あらゆる残留不溶物（例えば吸蔵樹脂）を濾別し、該溶液を5~30%酢酸中のアニオン交換樹脂、例えばバイオラド（BioRad）AG1X-8（アセテート型）（カリホルニア州、リッチモンドのバイオラド社）（BioRad Laboratories）に通すことである。ニンヒドリンテストで検出（サリン（Sarin）等の上記文献）したペプチド画分を併合し、凍結乾燥してペプチドをN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチン酢酸塩として、無機不純物を含まない状態で得る。しかし、依然としてスクヤベンジャーが残されている可能性がある。こうして得たペプチドはHPLC分析（以下参照）によれば純度50~80%であるが、それ自体は植物病原体を破壊する上で著しく有効である。単位重量当たり幾分高い活性をもつペプチドは該アニオン交換前またはその後に、該ペプチド塩を弱塩基、例えば5~10%の重炭酸アンモニウムまたは6Mグアニジン塩酸塩で処理して、酸性開裂条件下でセリンおよび/またはスレオニンを含むペプチド中で起こるすべてのN→Oアシルシフトを逆転させることにより得られる。典型的には、これは該ペプチド塩を5~10%重炭酸アンモニウムに溶解し、得られた溶液を15~25℃にて一夜放置し、次いで凍結乾燥により該ペプチドを回収することで達成される。

いくつかの場合において、特にペプチド鎖の組立て中メチオニンがそのスリホキシドとして保護されている場合、該ペプチド混合物を再度還元剤で処理して、あらゆる残留メチオニンスルホキシドをメチオニンに戻すことが有利である。この目的のために文献中に多くの試薬が記載されているが、（例えばDTT（ジチオスレイトール）およびDTE（ジチオエリスリトール）、MMA（N-メチルカプトアセタミド）が好ましい。この還元は典型的には、1~5mg/mlの約10%w/vMMA溶液中のペプチドを10~30%酢酸中でインキュベート（12~48時間、20~40℃にて窒素雰囲気下で行う）することにより実施され、これはA. クリエル（Cullis）の“N-Methylmercaptoacetamide (MMA) を用いるペプチド中のメチオニンスルホキシドの還元 (Reduction of Methionine sulfoxide in Peptides Using N-methylmercaptoacetamide),” アプライドバ



イオシシステムズ、ペプチドシンセサイザープレートン (Applied Biosystems Peptide Synthesizer User Bulletin) No. 17、(1987)、カリフォルニア州、フォスターシティー法によって行う。この還元はHPLCにより監視でき、還元が完了した際に該インキュベーションは停止される。メチオニンスルホキシドのメチオニンへの還元は不要である。というのは、本発明者等はこのようなメチオニンスルホキシド含有ペプチドが植物病原体に対し活性をもつことを明らかにしたからである。しかし、単位重量当たり高い活性をもつペプチドはこの還元法を実施することにより得ることができる。ペプチドをMMAで処理した場合、過剰のMMAおよび関連する副生物を、5~30%酢酸に溶した該ペプチド混合物の溶液をセファデックスG-25カラム (ニュージャージー州、ピスカタウェイのファルマーシアルKLBバイオテクノロジー社 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) に通すことにより除去し、かつ流出液を254 nmで監視する。ペプチド含有画分を併合し、凍結乾燥により乾燥する。

単位重量当たり最大の活性をもつペプチドは、これらを更にHPLCで精製することにより得られる。典型的には、1~2 mlの0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 中に溶解した該ペプチドを2.2×25 cm、10 $\mu$ 、300 Åビダック (Vydac) (マサチューセッツ、サウスボロのネストグループ (Nest Group)) C-4カラムに注入し、0.1% TFA含有アセトニトリル-水の種々の勾配で溶出する逆相HPLCにより精製される。このようにして得られるペプチドはN-末端、リジン、アルギニン、ヒスチジンおよびオルニチントリフルオロ酢酸塩であり、これらは一般に215 nmにおけるHPLC積分によれば純度95%以上である。該ペプチド画分の解析的HPLCは以下の如き溶出条件、即ち30分に亘るA中に0~60%のBを含むような線形勾配の下で、流量1.0 ml/minを利用した、0.46×25 cm、10 $\mu$ 、300 Å、ビダックC-4カラム上で、215 nmにおけるUV吸収により監視しつつ行われ、ここで溶媒Aは0.1% TFA水性溶液であり、溶媒Bは0.08% TFAのアセトニトリル溶液である。

殆どの場合、ペプチドの構造はアミノ酸分析または質量スペクトル分析で確認した。ペプチドのアミノ酸分析は、イオン交換カラム (例えば、ベックマンスフェロゲル (Beckman SpheroGel) AA-Liカチオン交換カラムで100℃にて24時間6 N塩酸で加水分解した後、ベックマンシステムゴールドアミノ酸アナライザ (Beckman System Gold Amino Acid Analyzer) (ベックマンインスツルメンツ社、カリフォルニア、フラートン) を用い、ニンヒドリン検出を利用したHPLCにより行われた。アミノ酸分析も、イムノダイナミックスにより行われ、これはウォーターズアッソシエーツピコタグシステム [Waters Associates Pico-Tag System, (ミリポア社 (Millipore Corporation), マサチューセッツ、ベッドフォード)] 上でアミノ酸をPTC (フェニルチオカルバミル) 誘導体として検出された。

このペプチドのアミノ酸分析は、またF. ウェスタル (Westall) 等の“ペプチドの15分酸加水分解 (Fifteen Minutes Acid Hydrolysis of Peptides),” Anal. Biochem., 1974, 61, pp. 610-613に記載の方法に従ってペプチド樹脂を使用して得た。これらの場合において、該ペプチド樹脂は塩酸単独の代りに1:1塩酸/プロピオン酸により加水分解される。生成する混合物は2~4容の洗浄用の水を使用して0.45 $\mu$ のナイロンフィルタを介して濾過し、濾液を凍結乾燥し、残渣を上記の如く分析した。

該ペプチドのFAB-MS (高速原子衝突-マスマスペクトル (fast atom bombardment-mass Spectrometry)) からのスペクトルは、高エネルギーイオン生成にキセノンを用い、8 KVおよび40 $\mu$ Aの電流で動作するイオンテック (Ion Teck) BLLNFサドルフィールドガン (saddled field gun) を備えたクラトス (Kratos) MS50RFマスマスペクトロメータを用いて得た。スペクトルは該ペプチドの4 mM溶液1 $\mu$ lと40 mM酢酸中の90%グ

リセリン  $1\mu\text{l}$  とをサンプルプローブの銅ターゲット上で混合するとにより調製した溶液から得た。この装置はヨウ化セシウムで校正し、質量範囲約 500 原子質量単位から予想される質量の上下に走査当たり 5~10 秒の速度で走査させた。また、データは DS90 データシステムとして得られるマルチチャンネルアナライザプログラムを用いて集め ( $M+H$ )<sup>+</sup> フラグメントを得た。

#### オリゴペプチドの化学的合成

ブリッジを含んでいようがいまいが、140 アミノ酸までの長さの本発明に記載した型のオリゴペプチドの化学合成は、上で t-Boc 側鎖保護法について記載した方法 (クラーク・ルイス (Clark-Lewis) 等 “造血細胞用のタンパク成長因子、インターロイキン-3 の自動化学合成 (Automated Chemical Synthesis of a Protein Growth Factor for Hemopoietic Cells, Interleukin-3),” *Science*, 1986, 231, pp. 134-139) を利用して達成できる。しかし、これらの方法は 75 アミノ酸までの長さのオリゴペプチドの合成について好ましく、また 60 アミノ酸までの長さのオリゴペプチドの合成により好ましい。ペプチドの合成のための “セグメント縮合 (segment condensation)” 法 [E. T. カイザー (Kaiser) 等, “セグメント合成縮合によるペプチドおよびタンパクの合成 (Peptide and Protein Synthesis by Segment Synthesis Condensation),” *Science*, 1989, 243, pp. 187-192] も 60~75 アミノ酸の長さのオリゴペプチドの好ましい合成法であるが、76~104 アミノ酸の長さのオリゴペプチドの合成にとってより好ましい。ペプチド合成のための “酵素的半合成 (Enzymatic Semisynthesis)” 法も、60~約 120 アミノ酸の長さのオリゴペプチド合成用の好ましいもう一つの方法である。例えば、V. デフィリップス (DeFilipis) 等、サーモリシンのカルボキシー末端フラグメントの半合成 (Semisynthesis of Carboxy-Terminal Fragment of Thermolysin),” *Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium*), ペプチド: 化学、構造および生物学 (Peptides: Chemistry, Structure and Biology), J. E. リバー (Rever) 等), 1990, pp. 1051-1053, エスコム (ESCOM) 刊、ライデン、ネザーランド; C. J. A. ワーローン (Wallone) 等, “酵素的に活性化したフラグメントの縮合によるチトクロームの欠損ミュータントの半合成 (Semisynthesis of a Deletion Mutant of Cytochrome by Condensation of Enzymatically Activated Fragments),” *ibids.*, (G. R. マーシャル (Marshall)), 1988, pp. 372-375; J. バンピンズバーゲン (van Binsbergen) 等, “合成ペプチドのトリプシン-触媒カップリング: 高収率でのホスホリパーゼ A2 ミュータントの半合成生産 (Trypsin-Catalyzed Coupling of Synthetic Peptides: Semisynthetic Production of Phospholipase A2 Mutants in High Yield),” *ibid.*, pp. 381-382 を参照のこと。

これら方法の組合せの改良もより長鎖のオリゴペプチドの合成に利用できる。かくして、75 アミノ酸までの長さのオリゴペプチドのセグメントは上記のように調製でき、次いで周期的にもしくはブロックとして、溶媒、例えば NMP、DMF または DMSO 中でカップリング剤としてジフェニルホスホリルアジドを用いて相互に結合できる [T. シオリ (Shiori) 等, “ジフェニルホスホリルアミド。改良クルチウム反応およびペプチド合成用の新規な便利な試薬 (Diphenylphosphoryl Azide. A New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction and for the Peptide Synthesis

esis), " J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, pp. 6203-6205]。

縮合後に除去することのできるArg (NO<sub>2</sub>) およびLys (TFA) の使用が、この方法では好ましい。単一のペプチドモノマーのマルチマーは同様な方法で調製できる [H. R. バッタチャルジー (Bhattacharjee) 等 "L-ドーパ残基を含む生体接合性類似ポリペプチド: 合成、重合および接合性 (Bioadhesive Analogue Polypeptides Containing L-Dopa Residues: Synthesis, Polymerization and Adhesive Properties), " Polym. Mater. Sci. Eng., 1980, 59, pp. 110-114]。オリゴマー化度は使用するジフェニルホスホアジドの量、または反応時間により制御できる。より高分子量のオリゴペプチドは水性溶媒に殆ど不溶であって、HPLCで精製できないので、カラムクロマトグラフィーで精製するか、あるいは混合物として直接使用する。

#### ジスルフィド結合オリゴペプチドの化学合成

Cys含有AMP PP、逆ペプチドおよびオリゴペプチドは、前の節で議論した同一のサイズ限界でここに記載した方法により合成できる。次いで、システインを選択的に酸化してジスルフィドブリッジ含有システインとする。この際、R. S. ホッジズ (Hodges) 等の "モデル合成ペプチドを用いたペプチド設計 (Peptide Design Using Model Synthetic Peptides), " Peptide Res., 1988, 1, pp. 19-30に記載の方法を利用する。典型的には、システイン含有ペプチドの溶液をリン酸緩衝液 (pH 3~9、好ましくはpH 7) (触媒量 (0.001~25%、好ましくは1.0%) の銅 (四塩、例えば塩化第二銅 (0.001~0.5M、好ましくは0.05Mの) 磷酸モノナトリウム、 $10^{-5}$  ~  $10^{-4}$  Mの塩化第二銅、0.01~1Mの、好ましくは0.5MのNaClを含む) 中で、室温にて一夜攪拌する。次いで生成するオリゴペプチドを精製する。

#### AMP PPの遺伝子的合成および精製

前に述べた如く、本発明によるAMP PP含有ペプチド、逆ペプチドブリッジのあるもの、フラグメントおよびオリゴペプチドは、また宿主細胞中に適当な調節シグナル例えば遺伝子配列に付加された遺伝子プロモータおよび遺伝子ターミネータ配列をもつ1種以上のペプチドをコードするデオキシリボヌクレオチドまたはDNA遺伝子配列を挿入し、タンパク合成の生物的過程を通して宿主細胞中でこれらペプチドをコードする遺伝子配列を発現させることによって調製し得る。この方法に用いる宿主細胞は原核細胞 (例えば、バクテリア細胞) または真核細胞 (例えば、植物または動物細胞) 起源のいずれであってもよい。大規模生産のために、バクテリアまたは酵母などの微生物宿主がこれら生物の発酵過程の進歩状態のために使用できる。また、他の遺伝子発現系をこれらペプチドの製造のために使用でき、これは例えば真菌 (例えば、ニューロスポラ (Neurospora))、培養ヒト細胞または昆虫細胞を含む。

また、AMP PP含有ペプチドおよび特に本発明に記載したオリゴペプチドの遺伝子工学的合成は特に有用である。既に述べたように、あらゆるブリッジ含有分子を除き、約2~約16ペプチドサブユニットを含むオリゴペプチドの製造にしばしば有用である。一般に、本発明で明らかにしたように、大きなオリゴペプチドの固層を基礎とする繰返し化学合成には技術的な限界があり、単一の合成では約140アミノ酸が実際上の限界である。前に述べたように、このサイズまでの化学的誘導されたペプチドを更に重合する化学的手段があるが、これらの化学的手段はこのようにして重合されるペプチドサブユニットの組成および数の正確な制御性に欠ける。従って、反復的化学合成によって可能となる以上に長いオリゴペプチドを生成する必要があるが、多くの重合生成物は余りに大きすぎるか、あるいは不適当なサイズであって、植物病原体に対し有効であり得ない。更に、本発明により例示される抗生物ペプチドは数10、数100あるいは数千もの長いアミノ酸残基の架橋をもつペプチドを配合でき、また遺伝子技術が規定されたサイズおよび組成の極めて長いオリゴペプチド並びにオリゴペプチドの合成に極めて適しているので、オリゴペ

チドおよびモノマー型抗生物ペプチドの生物学的製造が、本発明の範囲内で有用な多量の抗生物ペプチドを得る手段として好ましい。正確に規定された組成の大きなオリゴペプチドをコードする完全合成遺伝子製造における進展した技術および様々な生物学的機構によりかかるオリゴペプチドを安価に製造する手段における技術的進歩は、抗生物ペプチドの生物学的生産が未来におけるおよび低価値の作物種におけるAMP PPの生産などといったいくつかの例におけるより好ましい生産手段となり、また経済的に実施し得る唯一の利用可能な方法であり得る。

AMP PPをコードする遺伝子は、例えば完全に化学的な合成手段で調製でき、あるいはペプチドをコードする天然配列由来の配列の一部または全部を含むことも可能である。完全にデオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドの化学的合成は溶液化学の応用を通して達成でき、あるいは好ましくは固体担体上で実施できる。オリゴヌクレオチドのいくつかの合成化学が工夫されており、ホスホトリエステル、ホスファイトートリエステルおよびホスホアミダイトケミストリーを含む。M. H. カルターズ (Caruthers), "デオキシオリゴヌクレオチドの新規な化学的合成法 (New Methods for Chemically Synthesizing Deoxyoligonucleotides)," *Methods of DNA and RNA Sequencing*, (S. M. ワイズマン (Weizsman) 編、プラエガーパブリッシング社 (Praeger Publishers), NY, 1983, pp. 1-22 および K. イタクラ (Itakura) 等の "合成オリゴヌクレオチドの合成および利用 (Synthesis and Use of synthetic oligonucleotides)," *Ann. Rev. Biochem.* 1984, 53, pp. 323-356 参照。N, N-ジメチルアミノホスホラミダイトまたは $\beta$ -シアノエチルジイソプロピルアミノホスホラミダイトまたはデオキシリボヌクレオシドモルホリノ-メトキシホスフィンを含むようなホスホラミダイト合成化学が好ましい。というのは、成長中のオリゴヌクレオチド鎖へのヌクレオチドのカップリング効率がよく、しかも使用する化学試薬の安定性がよいからである。最も好ましいホスホラミダイト化学は $\beta$ -シアノエチルジイソプロピルアミノ-ホスホラミダイトを使用するものである。というのは、匹敵する中間体と比較して高い安定性をもち、またチオフェノールなどの有害な試薬を使用しないからである。S. L. ビューケージ (Beaucage) および M. H. カルターズ (Caruthers), "デオキシヌクレオシドホスホラミダイト-デオキシポリヌクレオチド合成用の新しい組のキー中間体 (Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis)," *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, pp. 1859-1862; L. T. マクブライド (McBride) および M. H. カルターズ, "デオキシオリゴヌクレオチドの合成に有用ないくつかのデオキシヌクレオチドホスホラミダイトの研究 (An Investigation of several deoxynucleotide phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides)," *ibid.*, 1984, 24, pp. 245-248; T. ドルパー (Dorper) および E. L. ウィナッカー (Wen 40 uacker), "オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成用のホスホラミダイト法の改良 (Improvements in the phosphoremidite procedure for the Synthesis of oligodeoxyribonucleotides)," *Nuc. Acids Res.*, 1983, 11, pp. 2575-2584; および S. P. アダムズ (Adams) 等, "2種のDN A 51-マーの合成におけるヒンダードジアルキルアミノヌクレオシドホスファイト試薬 (Hindered dialkylamino nucleosids phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers)," *J. Am. Chem Soc.*, 1983, 105, pp. 66 1-663 参照。簡単にいえば、固体担体上のホスホラミダイト化学は固体材料、例えば 50

ガラス、シリカゲル、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリスチレン、ニトロセルロースおよびいくつかの他の一般に化学的に不活性な材料に変性ヌクレオチドを付加することからなる。該ヌクレオチド塩基中のヌクレオチドホスフェート基、およびあらゆる環外窒素原子は化学基で該担体上で保護されており、その結果該オリゴヌクレオチド鎖の線形延長中の望まぬ副反応が阻止される。このような付加は種々のリンカーまたはスペーサ部分を介して行うことができるが、好ましいリンカーは一般に長鎖アルキルアミンである。これについてはM. D. マトゥシ (Matteucci) およびM. H. カルターズのU. S. P. 4, 458, 066を参照のこと。付加されたヌクレオチドは5'-糖位置において酸置換活性ジメトキシトリチル化学基で保護され、この基を例えばベンゼンスルホン酸、トリクロロ酢酸またはジクロロ酢酸で除去して、カップリング用の遊離5'-OH基とし、かくして追加のヌクレオチドの結合を開始する。この脱保護または活性化工程で使用する好ましい酸はジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸である。次いで、固体担体に付加されたヌクレオチドと同様に保護されたホスホラミダイトモノマーヌクレオシドを弱酸の存在下で添加して該5'-OH基の該ホスホラミダイト試薬への求核攻撃を促進する。このカップリング工程にとって好ましい弱酸はテトラゾール、アミン塩酸塩および3-ニトロトリアゾールである。最も好ましい弱酸はテトラゾールである。次に、該担体上のカップリングしなかったサイトを遊離ヒドロキシル基の無水酢酸でアシル化して遮断または封止する。この遮断工程で好ましい補助試薬は1-メチルイミダゾールである。天然のヌクレオチド間ホスフェートジエステル結合は後に、該固体担体上で成長しつつあるヌクレオチド鎖を柔和な酸化混合物で処理することにより、各ヌクレオチド添加サイクルにおいて発生する。この酸化工程はリン(III)をより安定なリン(V)酸化状態に転化し、かつあらゆる後の脱保護工程または活性化処理において、酸種例えばジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸によるヌクレオチド鎖の切断を防止する。ヨウ素は酸素ドナーとしての水と共に酸化種として使用される。好ましい補助試薬はテトラヒドロフランおよびルチジンを包含する。該固体担体の無水アセトニトリルによる洗浄後、脱保護/カップリング/酸化/遮断サイクルを必要な回数繰返して選択されたオリゴヌクレオチドまたは複数のオリゴヌクレオチドを調製でき、各時点において、適当な保護β-シアノエチルホスホラミダイトヌクレオシドを用いて、プリンまたはピリミジン塩基を担持する選ばれたヌクレオチドを挿入する。このプリン塩基は、好ましくは該挿入されたヌクレオチド上のアデニンまたはグアニンであり、また該ピリミジン塩基は好ましくはシトシンまたはチミンである。オリゴヌクレオチドの化学合成の簡略さは研究室作業のための実際の案内の進展並びに市販の自動化されたDNA合成装置の一般的利用へと導く。M. H. カルターズ、"遺伝子合成装置：DNA化学およびその利用 (Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses)," Science, 1985、230、pp. 281-285; およびJ. W. エフカビッチ (Efcavitch), "オリゴデオキシリボヌクレオチドの最適化化学合成用の自動システム (Automated system for the optimized chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides)," マクロモレキュラーシーケンシングアンドシンセシス、セレクトッドメソッズアンドアプリケーションズ (Macromolecular Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications) [アラン (Alan) R. リス (Liss) 社、NY]、1988、pp. 221-234 参照。市販の装置はいくつかの製造もと、例えばデュポン社 (Du Pont Company) (デラウェア、ウilmington)、ミリゲン/バイオサーチ社 (Milligen/Bioscience, Inc. (カリフォルニア、サンラファエル)) およびアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems: カリフォルニア、フォスタシティ) から入手できる。本発明で使用する装置はバイオサーチ (Bioscience) 8700またはアプライドバイオシステムズの391PCR-MAT EDNA合成装置であった。これら装置の動作および該装置と共に使用するβ-シアノエチルホスホラミダイト化学サイクルの詳細はバイオサーチ社のモデル8600/8700

指示マニュアルまたは該PCR-MATEモデル391DNA合成装置ユーザーズマニュアル(アプライドバイオシステムズパートNo. 900936、バージョン1.00、レビジョンA、1985年5月)に記載されている。

オリゴヌクレオチドの最後のカップリングサイクルは、5'末端ジメトキシトリチル基を残して又は離して完結することができる。好ましくは、ジメトキシトリチル基は、続いての完全な長さのオリゴヌクレオチドの精製に便利であるため、残される。完成され、保護されたオリゴヌクレオチドは精製の前に脱保護し、固体の支持体から開裂しなければならない。完成したオリゴヌクレオチドを有する固体支持体は、支持体樹脂からオリゴヌクレオチドを開裂するために、少なくとも1時間、新しい濃水酸化アンモニウムで室温で処理される。その後、固体支持体をより多い濃水酸化アンモニウムで洗浄し、合わせた濃水酸化アンモニウムを、保護された塩基から保護化学官能基を除去するために、シールされたバイアル中で、55~60℃で少なくとも8時間インキュベートする。その後、サンプルを冷却し、減圧下で蒸発乾固する。サンプルは、新しい濃水酸化アンモニウム又は少なくとも95容量%純度のエタノールから再蒸発させてもよい。その後、最終的なサンプルは、凍結(乾燥)状態で貯蔵することもでき、または滅菌蒸留水に再懸濁した後-20℃で貯蔵することもできる。PCR-Mate Model 391 user's manual, supra, and M. H. Caruthers et al., "Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method," *Methods in Enzymology* 154, (1987), 287-313参照。

上記の好ましい選択から引用される方法により製造された任意の開裂された及び脱保護されたオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で公知の1又はそれ以上のいくつかの方法により精製されうる。これらの精製技術には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー及び疎水的相互作用クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような好ましい方法の一つは、直立した12%ポリアクリルアミドスラブゲルによる、20×40×0.08cm、7M尿素、90mMトリス-HCl、pH8.3、90mMボレート、1-2mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)二ナトリウム中の、5'末端にジメトキシトリチル部分を欠くオリゴヌクレオチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動精製である。精製されるべき各オリゴヌクレオチドの部分(0.3-3.0A<sub>2</sub>。単位)は、減圧下で蒸発乾固され、少なくとも0.01%のプロモフェノールブルー及び少なくとも0.01%のキシレンシアノールを含むホルムアミド:1mMのEDTA二ナトリウム(9より大きい:1)中に再懸濁され、沸騰水浴中で2~3分間加熱され、氷スラリー中に即時に置かれ、そして個々のウェル(幅が少なくとも6mm)に置かれる。サンプルは、80~90Wで、陽極に向かって、プロモフェノールブルーが少なくともポリアクリルアミドゲルの2/3の位置に移動するまで電気泳動にかけられる。その後、全長のオリゴヌクレオチドを、該ポリアクリルアミドゲルを、一片のサラップのような柔軟な透明プラスチックラップに置き、これを、蛍光インディケーター化合物を含む薄層クロマトグラフィー板(例えばSilica Gel F-254; Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA)の最上部におき、該ポリアクリルアミドゲルを短波長の紫外線照射下で調べることで可視化する。その後、全長バンド材料をポリアクリルアミドゲル中で切り出し、種々の方法、例えば緩衝液中の電気泳動又は単純な拡散によりゲルから精製することができる。好ましい抽出方法は、0.5mlの0.3M酢酸ナトリウム、pH7.5への振盪しながらの拡散、及び続いてのフェノール:クロロホルム(1:1, v:v)による抽出及びエタノール沈殿である。その後、沈殿したオリゴヌクレオチドを適当な容量(通常10~1000μl)の適当な緩衝液、例えば10mMのトリス-HCl, pH7.5, 1mMのEDTA二ナトリウムに、又は滅菌蒸留水に再懸濁し、-20℃で貯蔵することができる。 "Purification of oligonucleotides using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis" in *Current Protocols in M*

olecular Biology, F. M. Ausubel et al., Eds., (1989) のユニット 2. 21 参照。

さらに好ましい別の精製方法であって、5' 末端にジメトキシトリチル部分を有するオリゴヌクレオチドの精製に非常に適するものは、逆相 HPLC カラム上での高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) である。そのような逆相 HPLC カラムには、種々のシリカ又は下記のような多くの業者から購入しうる樹脂をベースとするポリマーを詰めることができる: Millipore/Waters (Milford, MA), The Nest Group (Southboro, MA), Rainin Instrument Company, Inc. (Woburn, MA), J. T. Baker Inc. (Phillipsburg, NJ), Alltech Associates Inc. (Deerfield, IL), 又は Pierce Chemical Company (Rockford, IL)。オリゴヌクレオチドは、載置され、分画され、そして前記 HPLC カラムから例えばいくつかの適当な非破壊 (non-destructive) 緩衝液のいずれか中のアセトニトリル勾配により溶離される。好ましいアセトニトリル勾配は、0.1M のトリエチルアンモニウムアセテート、pH 7.0 緩衝液中、5%~40% の範囲、好ましくは 5~30% の範囲である。好ましくは逆相 HPLC カラムは、これに結合した直鎖アルキル部分、例えば炭素原子数 4、炭素原子数 8 又は炭素原子数 18 のアルキル鎖を含む。その後、精製された全長オリゴヌクレオチドを含む適当なフラクションを集め、減圧下で蒸発させ、3% (v/v) の酢酸水溶液中に室温で 10~30 分間で再懸濁させる。その後、脱トリチル化オリゴヌクレオチドをエタノール沈殿させるか、又は他の適当な手段、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより精製する。さもなければ、全長脱トリチル化オリゴヌクレオチドは、種々のタイプのカラム及び勾配材料を用いて HPLC により精製することもできる。G. Zon 及び J. A. Thompson, "A review of high-performance liquid chromatography in nucleic acids research," *BioChromatography* 1, (1986), 22-32 参照。

別のより好ましい方法は、疎水的相互作用クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの精製である。本発明の目的のためのこの精製技術は、常圧下で疎水樹脂による逆相クロマトグラフィーの形態である。水酸化アンモニウム脱保護及び開裂溶液中の粗生成物であるオリゴヌクレオチド混合物は、適当な緩衝液、例えば 1.0M のトリエチルアンモニウムアセテート、pH 7.0 中で平衡にした疎水性樹脂に加えられる。その後、結合したオリゴヌクレオチドを 2% のトリフルオロ酢酸に 1~3 分間暴露することにより脱トリチル化され、その後、水中の 15~40% のアセトニトリル中で回収される。その後、回収されたオリゴヌクレオチドは凍結乾燥され、上記のように適当な緩衝液又は滅菌蒸留水中に再懸濁される。

本発明の目的である部分的又は完全な合成遺伝子を製造するのには、1 又はそれ以上の合成オリゴヌクレオチドが必要であろう。任意の適当なオリゴヌクレオチド及び/又は天然マガイニン遺伝子のような天然遺伝子の部分もしくは全部は、加熱、尿素もしくはホルムアミドのようなカオトロピック剤との混合、又はアルカリ溶液への暴露のような手段による DNA の変性により、1 又はそれ以上の AMPPP をコードする遺伝子に集められうる。ホスフェート部分は、所望により、それらを欠く任意の DNA 又はオリゴヌクレオチドに、T4 ポリヌクレオチドキナーゼのような酵素を用いて酵素的に結合されうる。Current Protocols in Molecular Biology, supra. のセクション 3. 10 参照。本発明の範囲内の、追加の任意の DNA の存在下又は不存在下における遺伝子の製造において使用される任意のオリゴヌクレオチドは、その後、適当な手段、例えば室温への徐冷又はカオトロピック剤を除去するための透析により再結合又はアニーリングされる。これらのアニーリングされた DNA は、適当な酵素、例えば T4 DNA リガーゼで処理することにより共有結合されうる。前記の Current Protocols in Molecular Biology, supra. のセクション 3. 14 参照。



必要な場合及び適当な場合には、この手段により製造されたペプチドをコードする遺伝子生成物を、製造者の仕様書による制限エンドヌクレアーゼで処理することにより、又は当該技術分野で知られた方法により、遺伝子調節DNA配列に加えるために、製造することもできる。前記のT. Maniatis et al., *Molecular Cloning*, pp. 104-106 参照。

上記の方法は、本発明による大部分の又は全ての抗菌性ペプチド、例えばRAMPP又はRAMPPP及びオリゴペプチドをコードする遺伝子の製造のためにしうる。ペプチド及びオリゴペプチドをコードする遺伝子を製造するための別の方法を使用することもできる。この方法には、個々のペプチドサブユニット又は個々のサブユニットの群をコードするアニーリングされたDNA、例えばブリッジ分子(bridging molecule)をコードする遺伝子セグメントを製造することが含まれるであろう。関連する個々のアニーリングされたDNAの全てを結合することから製造されうるコンポジット遺伝子がインターラプションなしに所望のペプチドをコードするかぎり、少なくとも二つあるアニーリングされたDNAは、各々より小さいペプチドサブユニットの部分をコードすることも可能である。

アニーリングされたDNAの末端は、異なるDNA配列の末端の間のオーバーラッピングする相補的な短いDNA配列の結合を可能にするように選択される。より後の工程で、適当なDNAはアニーリングされ、連結されて、ペプチド又はオリゴペプチドをコードするより大きな遺伝子を形成する場合には、これらの結合部位は、少なくとも一つのペプチドサブユニットのコード領域を次のペプチドサブユニット又は関連するブリッジ分子にインターラプションなしに維持する。例えばオリゴペプチドをコードするより大きな遺伝子の種々の部分をコードする二つ以上のDNAセグメントは、所望の最終的なオリゴペプチドのサイズ及び組成に依存して、適当なDNAコード配列を維持するような付着が考慮されうる。より小さなDNAセグメント上のオーバーラッピング及び相補的末端の領域は、偶然起こる望ましくない二つ以上のDNAセグメントの結合を妨げるように同等でないように選択されうる。これらのオーバーラッピング末端は、プリカーサーであるアニーリングされたDNAを、上記の遺伝子調節DNA配列に追加されるDNAの製造において記載した制限エンドヌクレアーゼにより処理した生成物と同等でも同等でなくてもよい。

本発明の範囲内のより大きなオリゴペプチドをコードするより大きなDNA断片に結合される予定の上記のアニーリングされたDNA断片は、いくつかの手段、例えば変性方法の逆転の前の加熱又はアルカリ溶液への暴露により穏やかにアニーリングすることにより結合されうる。アニーリング工程は、好ましくは、工程中に実質的に個々のアニーリングされたDNAを変性しない。アニーリングされたDNAは、その後、適当な酵素、例えばT4 DNAリガーゼで処理することにより共有結合されうる。適当なDNAセグメントは、同時に又はブロックで互いに結合され、続いて少なくとも一つの追加の結合工程が起こり、より大きなオリゴペプチドをコードする最終的なDNA断片が形成される。最終的なDNAフラグメントを得る前に、DNAセグメント結合のための追加のサイクル又は工程が必要とされる場合は、連結の中間段階で得られる結合されたDNAセグメントは、標準的な手段、例えばゲル電気泳動による精製、サイズ排除クロマトグラフィー及び/又はエタノール沈殿により精製されるべきである。前記のCurrent Protocols in Molecular Biology, supra. の第2章参照。その後、より大きなオリゴペプチドをコードする最終的なDNAフラグメントに、上記の遺伝子調節DNA配列を付加することもできる。

定められた宿主細胞においてタンパク質として発現することができるようにするために、ペプチドをコードする遺伝子に付加される遺伝子調節シグナルは、宿主細胞の生物機構により認識され、宿主細胞内のDNAポリメラーゼによりDNA配列のメッセンジャーRNA首己列(mRNA)への転写を誘導するDNA配列である、遺伝子プロモーター配列を含みうる。その後、このmRNAは、宿主細胞内のリボソーム上でタンパク質生成物に翻訳されることができなければならない。遺伝子プロモーター配列は、上記の転写及び翻訳の理論に適合する限り、一部又は全部が、宿主細胞のものとは似ていない細胞に見出され

るプロモーター配列から誘導されうる。例えば、グラム陽性菌である *Bacillus subtilis* からの増殖遺伝子 (vegetative gene) プロモーター配列は、グラム陰性菌である *Escherichia coli* におけるペプチド遺伝子の発現に満足なものでありうる。

1以上のAMP PPの発現のためのAMP PP遺伝子に追加されうる第二の遺伝子調節因子は、遺伝子ターミネーター又はポリアデニル化配列である。このDNA配列は、さらに転写することを阻害し及び停止させ、真核細胞の場合には1以上のアデノシンヌクレオチドをmRNAの3'末端に直接付加する情報を提供する遺伝情報を含む。遺伝子ターミネーター配列は、宿主細胞のゲノム由来又は宿主細胞内での転写を適当に終了させることが有効であることが知られている非類似の細胞のゲノム由来のターミネーター配列の一部又は全部を含む。そのような配列の例は、*Salmonella typhimurium* his operon rho-独立転写ターミネーター配列でありうる (例えばN. E. Winkler, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology [F. C. Neidhardt, Ed-in-chief; American Society for Microbiology, 1987]、第25章参照) 又は *Agrobacterium tumefaciens* Tiプラスミド由来のオクトピンシンターゼターミネーター配列 (例えばH. DeGreve等、"Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene", J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982)、499-511参照)。

ペプチド発現遺伝子又は遺伝子調節シグナルが付加された遺伝子は、好ましくは、関連遺伝子によりコードされるAMP PPを含む1以上のペプチドを発現する目的のために原核生物又は真核生物由来の宿主細胞に導入される。導入手段は当該技術分野でよく記載されており、遺伝子発現が要求されている宿主細胞のタイプに依存する。例えば、バクテリア細胞の外部から供給されたDNA、例えば *Escherichia coli* の細胞による形質転換は、塩化カルシウム法により達成されうる。典型的には、遺伝子調節シグナルが付加されたペプチド遺伝子は、形質転換法の前に適当な形質転換ベクターに共有結合される。そのようなベクターは、*Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses* by R. L. Rodriguez及びD. T. Denhardt (Butterworths, Boston; 1988) に記載されている。T. Maniatis等、*Molecular Cloning, supra*, pp. 247-255。

好適な宿主細胞中でこのような遺伝子発現系で一旦発現されると、ペプチドは通常的手段により抽出されてもよく、且つ/または精製されてもよく、部分的に精製された形態または実質的に精製された形態で植物病原体に対して使用し得る。ペプチドを宿主細胞から抽出する方法は、宿主細胞の熱及び/または酵素による溶解、脂質溶媒または水性/有機ミセル溶液中の可溶化、並びに宿主細胞をフレンチプレスにより押しつけることによる細胞膜及び/または細胞壁の加圧断裂を含む。宿主細胞としての細菌の場合に関する細胞溶解に好ましい方法は、求められている生産の規模に依存する。大規模の生産に関して、細菌細胞の熱または加圧断裂が好ましい。例えば、H. Hellebust, "Different approaches to stabilize a recombinant fusion protein", *Bio/Technology* 7, (1989)、165-168を参照のこと。抽出されたAMP PPは、更に精製しないでそれらのそのままの形態で使用されてもよく、またはサイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー等の如き方法による細胞内容物の1回以上の分別の適用により部分的または完全に精製されてもよい。

その他の可能性は、ペプチドを暗号化するこれらの遺伝子を発現し、且つAMP PPをタンパク質生産物として発現するための宿主受容体として全能植物細胞を使用することであ

り、それにより植物細胞は稔性作物を再生し得る。この後の場合、受容体植物は遺伝的に形質転換された植物またはトランスジェニック植物と称される。外来遺伝子を植物に導入するには、幾つかの既知の方法がある。選択の方法は、主として、形質転換される作物の種類に依存する。しかしながら、これらの方法の多くが本発明により使用し得る。

双子葉植物中へのDNAの移入に特に有効である一つの方法は、アグロバクテリウムの使用を伴う。この方法では、関係する遺伝子（例えば、カリフラワーモザイクウイルス3'5' S5' プロモーター領域及び3' OCSターミネーター領域を有するAMP<sup>PP</sup>の遺伝子）が選択遺伝子（例えば、トランスポゾンTn5のネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（nptII）、ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ等を暗号化する遺伝子）で小さい組換えプラスミド中にスプライシングされたT-DNA領域の境界の間に挿入される。次いで組換えプラスミドが直接の形質転換または三親交配によりアグロバクテリウム宿主に導入される。次いで、関係する遺伝子を有するアグロバクテリウム株が、細菌を2～3日の期間にわたって植物飼料（例えば、葉盤）で同時培養することにより双子葉植物組織の形質転換に使用される。形質転換された細胞は適当な薬剤による選択により回収され、次いで植物が再生し得る。R. B. Horshら著、"A Simple and General Method of Transferring Genes into Plants", Science 227, 1985, 1229-1231を参照のこと。

植物細胞、特に更に扱い難い単子葉作物の植物細胞の形質転換に使用されたその他の方法は、化学的に誘導される移入（例えば、ポリエチレングリコールによる；H. Lorzら著、"Gene transfer to cercal cells mediated by protoplast transformation", Mol. Gen. Genet. 199, (1985), 178-182を参照のこと）、バイオリスティクス（biolistics）（W. J. Gordon Kammら著、"Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants", The Plant Cell, 2, (1990), 603-618）、マイクロインジェクション（G. Neuhäuslerら著、"Transgenic rapeseed plants obtained by microinjection of DNA into microspore-derived proembryoids", Theor. Appl. Genet., 74, (1987), 30-36）、及びその他（I. Potrykus, Bio/technology 9, (1990), 535-542）を含む。Bascombらの上記の文献に記載されているように、天然に産出されるタンパク質はアミノ末端またはN-末端に結合されたMetアミノ酸をしばしば含む。これらのメチオニンは時々ホルミル化される（"Met"と称される）。それ故、本明細書に開示されたタンパク質はまたN-末端に付加されたメチオニンまたはN-ホルミル化メチオニンを含んで生産されることがある（"Met-タンパク質と称される"）。

#### シグナルペプチド

病原体は通常細胞、特に植物組織を細胞の外部の場所から攻撃するので、宿主植物細胞を保護することを目的とするタンパク質は細胞から分泌されることを必要とする可能性がある。これは、ターゲッティングペプチドとして文献に知られているペプチド配列（G. von Heijne "The Signal Peptide" J. Membrane Biol. 115, (1990), 195-201；S. F. Nothwehr及びJ. I. Gordon著、"Targetting of Proteins into the Eukaryotic Secretory Pathway: Signal Peptide Structure/Function Relationships" Bioassays, 12, (1990) 479-484；並びにK. Verner及びG. Schatz著、"Protein Translocation Across Membranes", Science, 24, (1988), 1307-1313）をペプチドのN-末端に付加することにより達成し得る。

ターゲッティングペプチドまたはシグナルペプチドは、その他のペプチドまたはタンパク質のN-末端に結合される場合に、そのペプチドまたはタンパク質を特定の細胞下の区画、好ましくは細胞外の空間に向けるのに役だつものである。本発明のターゲッティングペプチドまたはシグナルペプチドの例は、ニンジンエクステンシンのペプチド (SEQ ID NO. 21) (J. Chen及びJ. E. Varner著、"An Extracellular Matrix Protein in Plants, Characterization of a Genomic Clone for Carrot Extensin" *Embo J.*, 4, (1985) 2145-51) 及びオオムギα-アラミラーゼのペプチド (SEQ ID NO. 22) (J. C. Rogers及びC. Milliman著、"Isolation and Sequence Analysis of a Barley Alpha-Amylase cDNA Clone" *J. Biol. Chem.* 258, (1983), 8169-74; T. H. D. Ho. ら著、"Regulation of Gene Expression in Barley Aleurone Layers", *Molecular Biology of Plant Growth Control*, Alan R. Liss, Inc., (1987), 35-49頁; C. R. P. Knoxら著、"Structure and Organization of Two Divergent Alpha-Amylase Genes from Barley", *Plant Mol. Biol.*, (1987), 9, 317; 並びにB. Khursheed及びJ. C. Rogers著、"Barley Alpha-Amylase Gene; Quantitative Comparison of Steady-State mRNA Levels from Individual Members of the Two Different Families Expressed in Aleurone Cells", *J. Biol. Chem.*, 263 (1988), 18953-18960) である。

ニンジンエクステンシンシグナルペプチドが本発明に使用するのに好ましい。上記の文献に記載された理由から、ターゲッティングペプチドは、通常、そのN-末端に付加されたメチオニンまたはホルミル化メチオニンを有する。本発明のペプチドまたはオリゴペプチド (そのN-末端に結合されたメチオニンまたはホルミル化メチオニンを含み、またはそれらを含まない) へのターゲッティングペプチドの付加は、ペプチドの効力に影響すべきではない。何となれば、ターゲッティングペプチドは、通常、細胞外の空間への輸送中にプロテアーゼによりペプチドから開裂されるからである。

AMPPPのN-末端に付加されたシグナルペプチド配列を含む本発明の範囲内のペプチドの例は、

(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 1);

(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 6);

(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 2);

(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 1); 及び

(SEQ ID NO. 21) - (SEQ ID NO. 2) - (SEQ ID NO. 5) - [(SEQ ID NO. 10) - (SEQ ID NO. 5)], - (SEQ ID NO. 1) - (SEQ ID NO. 5) - (SEQ ID NO. 10); (この場合、(SEQ ID NO. 5) に関して  $Xaa^1 - Xaa^5$  は Gly である) である。

上記のオリゴペプチドのシグナルペプチドが発現及び細胞外の空間への分泌後に開裂される場合、放出されたオリゴペプチドは微生物病原体による宿主植物の侵入の際に有効である。

### ペプチド及びオリゴペプチドの用途

本発明により具体化された抗生物質ペプチドは、微生物の増殖または生存を抑制することが所望される幾つかの日常の状況で広い用途をもち得る。本発明者らは、植物の微生物病原体により生じた作物の破壊の経済的な影響を軽減することにより作物の収穫量を高めることに於けるAMP PPの適用に特に関心がある。しかしながら、本発明のAMP PPはまた微生物により引き起こされるヒトまたは動物の病気の治療に於ける医薬品、貯蔵または輸送中の食品保存の目的のための食品添加物、家庭用もしくは医療用の消毒剤、または化粧品、医薬品もしくはその他の製品の防腐剤として有益であり得る。本発明のAMP PまたはAMP PPは、これらの状況のいずれか、または全てに於いて、それ自体で、またはヒト、動物もしくは植物の微生物病原体に対して有効であるその他の化学化合物もしくは製薬化合物と組み合わせて有益であり得る。

10

### ペプチド及びオリゴペプチドの外部適用

本発明のペプチド及びオリゴペプチドの外部適用が、例えば、病原体に対して植物を保護するのに使用される場合、使用されるAMP PPは $1 \sim 1000 \mu\text{g/ml}$ のAMP PPを含む液体溶液または懸濁液を生成するように希釈されるか、またはダストとして適用されるように希釈剤固体と混合されることが予想される。適用の正確な性質は、標的とされる特別な病原体に一部依存する。特定の作物及び病原体への適用の一般的な方法を採用するための詳細な方法は、Methods For Evaluating Pesticides For Control of Plant Pathogens, K. D. Hickey編集、The American Phytopathological Society (St. Paul, MN), 1986に見られる。本発明のこの特徴により特に有益であると予想される適用の方法は、全体の植物またはその部分の断続的な水性または非水性のスプレー、種子被覆、及び灌漑系（例えば、温室ミストベンチ）中の混入を含む。その製剤に添加し得るアジュバントは、可溶化を助けるための薬剤、湿潤剤及び安定剤、またはマイクロカプセル化された製品を製造する薬剤を含む。その製剤は、高濃度の無機塩、特に二価のカチオン、例えば $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ 、または $\text{Fe}^{++}$ を含まないことが好ましい。また、外部適用は、生存可能な形態の組換え微生物またはAMP PPを失活しない方法により生育し得ない形態に変換された後の組換え微生物を使用し得る。生存可能な組換え微生物がAMP PPを送出するのに使用される場合、それらが標的植物を集落形成する能力を有することが好ましい。

20

30

### 培養植物細胞によるペプチドの植物毒性スクリーニング

Bascombらの上記の文献は、分離された植物葉緑体を使用する抗菌ペプチドに関するスクリーニング技術を開示していた。葉緑体に対するこれらの抗菌ペプチドの効果は、植物組織中の特別なペプチドの存在及び可能な発現と関連する潜在的な植物毒性の一般的な指示であった。また、Bascombらの上記の文献は、最小のレベルの植物毒性を有する抗菌ペプチドを使用することが望ましいことを開示していた。しかしながら、このスクリーニング技術は植物毒性の指標として幾つかの利点を有するが、それは葉緑体の収集及び使用を必要とする点で不便である。更に、そのスクリーニング法は植物毒性の一般的な指標としてのみ意図されるという事実のため、生じたデータは、AMP PP RAMP PPまたはオリゴペプチドを使用しようとする特定の植物細胞または植物組織に対する毒性を必ずしも予測しない。詳しくは、葉緑体に対する特別な抗菌ペプチドの植物毒性作用は、葉緑体の特異な構造及び膜の化学的性質のために、化学的に類似しない植物の原形質膜またはその他の細胞下の細胞器官の膜に対する抗菌ペプチドの植物毒性の指標では必ずしもないのである。

40

本発明者らは、従来の植物毒性スクリーニング法よりも更に有効である培養植物細胞を使用する新規なスクリーニング法を発見した。何となれば、それは、分離された葉緑体の使用を必要としないからである。更に、本発明のスクリーニング技術は、例えば、宿主細胞の膜の化学的性質に対する抗菌ペプチドの植物毒性作用の更に正確な反映である。更に、本発明により使用される代謝終点は、分離された葉緑体アッセイにより測定されるような酸素発生ではなく、酸素消費である。それ故、種々の代謝経路に於ける種々の抗菌ペプチ

50

ドの植物毒性の影響に関するデータを得ることが、本発明の使用により可能である。本発明のアッセイが植物細胞に関して説明されるが、その技術はその他の型の細胞にも同様に適用し得ることが理解される。本発明のこの特徴の別の利点は、特定の宿主植物細胞に関して特定の抗菌ペプチドの植物毒性作用を試験する能力である。それ故、特別な抗菌ペプチドを発見し得る遺伝子を含む特別な遺伝子型の遺伝子導入トウモロコシを生産しようとする場合には、遺伝子操作の前にトウモロコシ植物細胞に関してこのペプチドの植物毒性作用を試験することが可能である。それ故、潜在的な宿主細胞及び／または宿主組織と抗菌ペプチドの適合性が推定される。

植物細胞に関して、植物細胞または植物組織に対するペプチドの相対的な植物毒性の目安は、細胞懸濁液として正しく維持された細胞培養物に対してペプチドを試験することにより測定し得る。培養された全細胞懸濁液は、細胞懸濁液を開始し、維持するための通常の方法、例えば、the Handbook of Plant Cell Culture, 1~3巻、(マクミラン・パブリッシング社(Macmillan Publishing Company)、ニューヨーク、NY、1983-84)に説明されているような方法を使用して生成し得る。植物毒性応答は、酸素消費に関する特別なペプチドの効果を観察することにより細胞系中で実証し得る。特に、次第に増加する濃度のそのペプチドを測定数の懸濁細胞でインキュベートすることが減少された酸素消費をもたらすことが実証し得る場合には、用量応答関係があらゆるペプチドに関して推定し得る。

同様に、次第に増加する数の培養全細胞による単一濃度のペプチドのインキュベーションが酸素消費の総合の減少された抑制をもたらすことが実証し得る場合には、容量応答関係が所定のペプチドに関して推定し得る。キュベットアッセイが、これらの測定に一般に使用される。

全細胞の酸素消費の抑制率(%)を実際に試験するためにキュベット中に使用される溶液は、単に、ペプチドが添加される水を含んでもよく、または、それはペプチドが添加される通常の溶液(その中で、細胞懸濁培養物が生育される)からなっているもよい。これらの溶液は、蔗糖、グルコース、フラクトース、キシロース及びアラビノースの如き糖を含んでいてもよい。無機塩、例えば、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、ホウ酸、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、リン酸カルシウム、塩化コバルト、硫酸第二銅、エチレンジアミンテトラ酢酸、塩化第二鉄、クエン酸第二鉄、硫酸第二鉄、酒石酸第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、硫酸マンガン、三酸化モリブデン、モリブデン酸、塩化ニッケル、硫酸ニッケル、塩化カリウム、ヨウ化カリウム、硝酸カリウム、リン酸カリウム、硫酸カリウム、硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、硝酸亜鉛、及び硫酸亜鉛のあらゆる組み合わせが含まれていてもよい。同様に、有機物、例えば、活性炭、アデニンヘミスルフェート、アミノ安息香酸、6-ベンジルアミノプリン、D-ビオチン、パントテン酸カルシウム、塩化コリン、ジメチルアリルアミノプリン、葉酸、グリシン、インドール-3-酢酸、ミオイノシトール、インドール-3-酪酸、キネチン、 $\alpha$ -ナフタレン酢酸、ニコチンアミド、ニコチン酸、ペプトン、ピリドキシンHCl、リボフラビン、チアミンHCl、ビタミンA、ビタミンB12、及びビタミンDのあらゆる組み合わせが含まれていてもよい。上記の薬剤のいずれか、または全部の混合物が有益であり得る。含まれる場合、夫々の薬剤の濃度は一般に0~1モルの量で存在する。また、溶液pHを4~9の好ましい範囲に維持するために、緩衝剤が細胞溶液中に含まれていてもよい。これらの緩衝剤の例は、トリス(トリス-[ヒドロキシメチル]アミノメタン)、MES(s-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)、酢酸塩、及びHEPES(N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N-[2-エタンスルホン酸])である。使用される場合、これらの緩衝剤は一般に約0.01%~約10%(w/v)の量で存在する。上記の植物毒性アッセイで試験される細胞懸濁液の全容積は10 $\mu$ l~1 $\mu$ lの範囲であり得る。本発明に有益な細胞の実際の量は、キュベット当たりのごくわずかな数の細胞の少ない量から、キュベットのサイズ及びマグネチックスターラによる細胞懸濁液の一定の攪拌の必要性により制限される多い量までの範囲であつてもよい。試験し得る細胞の最小数は、記録できる量の酸素を消費する数

である。この消費は、当業界で利用できる種々の技術及び装置、例えばワーブルグ (Warburg) 装置または、好ましくは、酸素電極により監視し得る。"The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis", D. Walker, 1987, Hansatech Ltd., Kings Lynn, Norfolk, 英国を参照のこと。

また、本発明によれば、試験のために植物細胞原形質体を使用することが可能である。本発明に使用される原形質体は、その細胞壁が除去された植物細胞である。これは、リグナーゼ、セルラーゼまたはその他の既知の酵素の使用により酵素により行うことができ、または浸透圧衝撃と組み合わせた組織スライシングの如き機械的手段により行うことができる。分離された原形質体の使用は、測定のための試薬として原形質体を調製するのに必要とされる追加の時間及び労力を除いて、本発明のスクリーニング技術の利点の多くの実現を可能にする。更に、細胞壁と特別な抗菌ペプチドとの間の潜在的な相互作用を測定する能力の欠如がある。

10

下記の実施例は、本発明の概念を更に説明する目的のために示される。それらは、限定することを目的としない。

これらの実施例は、RAMPPP及びオリゴペプチドを含む幾つかのペプチドに関するものである。便宜のため、これらのペプチドを、表1に同定された化合物を表すのに使用される任意の数で指定した。

【表1】

20



ペプチドNo.	ペプチド	SEQ ID NO.	
1	マガイニン 2	(SEQ ID NO. 2)	
2	マガイニン 1	(SEQ ID NO. 1)	
3	セクロピンA-NH <sub>2</sub>	(SEQ ID NO. 8)	
4	P 1	(SEQ ID NO. 6)	
5	Mag 2 ダイマー	(SEQ ID NO. 2)	
	(頭-尾結合)	(SEQ ID NO. 2)	
6	Mag 2 ダイマー (橋かけ)	(SEQ ID NO. 2)	10
		(SEQ ID NO. 5)	
		(SEQ ID NO. 2)	
7	P G L <sup>c</sup>	(SEQ ID NO. 7)	
8	リバースマガイニン 2	(SEQ ID NO.10)	
9	Met-Mag 1 ダイマー		
	(頭-尾結合)	Met-(SEQ ID NO. 1)-	
		(SEQ ID NO. 1)	20
10	[Glu 8 ]Mag 2	(SEQ ID NO. 3) **	
11	Met [Arg 7, Glu8, Des Ser 23] Mag 1	Met-(SEQ ID NO. 3) **	
12	Met [Arg 7, Glu 8, Pro 23] Mag 1	Met-(SEQ ID NO.20)	
13	Cys [Arg 7, Glu 8, Pro 23] Mag 1	Cys-(SEQ ID NO.20)	30
14	ジスルフィド連鎖された ペプチドNo.13	(SEQ ID NO.20)-S-S- (SEQ ID NO.20)	
15	頭-尾結合されたペプチド No.11 と No.12***	(SEQ ID NO. 3) ** (SEQ ID NO.20)	
16	Met-頭-尾結合されたペプチド	Met-(SEQ ID NO. 6)	
	No.4と No.12***	(SEQ ID NO.20)	40
17	Met ペプチド No.16	Met-(SEQ ID NO. 6)- (SEQ ID NO.20)	
18	リバースマガイニン 1	(SEQ ID NO. 9)	
19	Ser-マガイニン 2	Ser-(SEQ ID NO. 2)	

\*\* は最も密接に関連する (SEQ ID NO.) を示す。

\*\*\* は、このペプチドモノマーの N-末端 Met の排除を示す。

(SEQ ID NO. 5) の Xaa<sup>1</sup>-Xaa<sup>5</sup> は夫々 Gly である。

## 【実施例】

## 実施例1：ペプチドNo. 5の調製

ABIモデル430Aペプチド合成装置を用い、*t*-Boc保護基、NMP中のDCC/HOBT生成した活性エステル並びに側鎖保護基としてGlu(OBzl)、His(Bom)、Lys(C1-Z)およびSer(Bzl)を使用して*t*-Boc-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂を調製した。この合成は0.5mM(740mg)*t*-Boc-Ser(Bzl)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(置換度=0.68mM/g)から開始し、該樹脂を該装置により利用される標準的NMP/*t*-Boc化学サイクルに従って反復的脱保護、中和およびカップリング工程に付した。各カップリング工程の終了時点で、該樹脂の試料をニンヒドリン監視のために採取(上記のサリン(Sarin)等の文献参照)したところ、各工程で98.4%以上のカップリング効率を示した。10

該樹脂の約2/3をMag2-OH(ペプチドNo. 11:実施例13)および(Mag2)-(Gly)<sub>5</sub>-(Mag2)-OH(ペプチド6:実施例2)の合成で使用するために取り出した。次に、*t*-Boc-(Mag2)-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の合成を同様な方法で完了したが、最後の19アミノ酸の合成にはダブルカップリングを利用した。*t*-Boc-(Mag2)-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の収量は0.6909であった。

該N-末端*t*-Boc基はTFAを使用して該ペプチド合成により除去し、また該ペプチドを次に脱保護し、かつ以下の低/high HF法を利用して該樹脂から開裂した。即ち、0.39gのペプチド-PAM樹脂混合物を0℃にて2時間、1.0mLの無水HF、2.6mlのDMSおよび0.4mlのp-クレゾールを含む溶液と共に攪拌した。該HFおよびDMSを蒸発させた後、該ペプチド-樹脂混合物を、-10℃で30分および0℃で30分、新たな7mlのHF、0.5mlのアニソール、0.3mlのDMS、0.2mlの1,2-エタンジチオールおよび3.0mg 2-メルカプトピリジンを含む溶液と共に攪拌した。HFおよび他の揮発分を蒸発させた後、該樹脂をクロロホルムで膨潤し、この混合物を3回5mlのエーテルで洗浄し、3mlのBMEと共に30分攪拌し、3回3mlの1:1 15%酢酸/BMEでおよび15mlの0.1%TFAを含む50%水性アセトニトリル溶液で1回抽出した。水性抽出液を併合し、10mlのエーテルで3回抽出し、凍結乾燥して、152mg(約65%)のペプチド混合物を得た。この粗製ペプチドを約4mlの1N酢酸(1%のBMEを含む)に溶解し、1N酢酸中の2.6×10cmのバイオラド(Bio-Rad)AG1X-8イオン交換カラム(アセテート型)に通して、弗化物塩を除去し、該ペプチドを酢酸塩形に転化した。ニンヒドリン監視(上記のサリン(Sarin)等の文献参照)により検出された該ペプチド画分を併合し、凍結乾燥して122mgのペプチドを得た。次に、このペプチドを40mlの10%重炭酸アンモニウムに溶解し、室温にて、窒素雰囲気下で24時間攪拌した。この溶液を凍結乾燥し、得られた残渣を繰り返し1%BMEを含む1Nの酢酸から凍結乾燥して、最終的に199mgのペプチドを得た。30

最終的な精製は、ペプチド(10-15mg)を2.2×25cm、10μ、300Åのビダック(Vydac)C-4カラムに繰り返し注入し、60分に渡りA中にBを0%-60%の線形勾配で含む溶出液で溶出した。流量は6.0ml/minであり、溶媒Aは0.1%TFAであり、溶媒Bは0.08%TFAのアセトニトリル溶液であり、監視は235nmのUVを使用して実施した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、51.7分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度95%以上であることが示された。構造をFAB-MSにより確認した。amuでの理論値(M+H)<sup>+</sup>は4917.3であり、実測値は4917.8であった。40

## 実施例2：ペプチドNo. 6の調製

*t*-Boc-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(680mg)を実施例1と同様にして調製し、残りのペプチドは同様な手順で結合させたが、第2のMag2単位のアミノ酸はダブルカップリング法を利用して付加した。*t*-Bot-(Mag2)-(Gly)<sub>5</sub>-(Mag2)-OCH<sub>2</sub>PAH樹脂の収量は737mgであった。*t*-Boc基の除去後 50

実施例9：ペプチドNo. 15の調製

所定のペプチド-PMA樹脂(1.05g)を、実施例7で調製したt-Boc-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の約1/3から、ダブルカップリング法および実施例13記載の手順を使用して調製した。t-Boc基を除去した後、脱保護および開裂を実施例1の手順を利用して実施して、粗製ペプチド562mg(84%)を得た。実施例1記載の如くイオン交換およびHPLC精製を実施した。但し、60分に及ぶ、A中の40%B含有溶出液からA中に60%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのウンデカトリフルオロ酢酸塩形にある、43.8分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度95%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

10

実施例10：ペプチドNo. 16の調製

t-Boc-P1-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(1.40g)を、実施例7で調製したt-Boc-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の約1/3から、ダブルカップリング法、Trp(CH<sub>3</sub>O)および実施例1記載の手順を使用して調製した。t-Boc基を除去した後、681mgのペプチド樹脂を、実施例1に記載の手順(但し、該高HF溶液に3mgのスクロールをも添加した)に従って脱保護および開裂を実施して、粗製ペプチド347mgを得た。このペプチドを実施例1記載の手順でイオン交換クロマトグラフィーおよび重炭酸アンモニウム処理により精製した。40分に及ぶ、A中に30%Bを含む溶出液からA中に65%Bを含む溶出液までの濃度勾配を利用して2.2mmX25cm、300Åのビダック(Vydac)C-18カラム上でのHPLC(流量は1ml/min)によりこの生成物の分析を実施した。この分析は、恐らく該ペプチドのデカトリフルオロ酢酸塩形にある主ピークが19分に溶出されることを示した。構造はFAB-MSにより確認した。

20

実施例11：ペプチドNo. 17の調製

実施例1記載の手順を使用してt-Boc-Metをダブルカップリングして、実施例10で調製した740mgのt-Boc-P1-[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂とした。t-Boc基を除去した後、実施例10の手順で741mgの該ペプチド樹脂を脱保護かつ開裂して305mg(66%)の粗製ペプチドを得た。該ペプチドの精製は実施例1の手順で実施したが、60分に及ぶ、A中の35%B含有溶出液からA中に55%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのドデカトリフルオロ酢酸塩形にある、57.5分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度90%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

30

実施例12：ペプチドNo. 18の調製

t-Boc-R-Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(930mg)を実施例4で調製したt-Boc-[Ala<sup>1,5</sup>-Gly<sup>2,3</sup>]R-Mag2-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の残りから、実施例1記載の手順で調製した。t-Boc基を除去した後、実施例1の手順で920mgの該ペプチド樹脂を脱保護かつ開裂して296mgの粗製ペプチドを得た。該ペプチドの精製は実施例4の手順で実施したが、A中の20%B含有溶出液からA中に40%Bを含む溶出液への濃度勾配を使用した。恐らく該ペプチドのヘキサトリフルオロ酢酸塩形にある、30.2分に溶出される主ピークを集めた。これはHPLCにより純度97%以上であることが示された。構造はFAB-MSにより確認した。

40

実施例13：ペプチドNo. 11の調製

t-Boc-Met[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Des-Ser<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂を0.6mM(923mg)のt-Boc-Lys(C1-Z)-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂(置換度=0.65mM/g)から、Arg(Mts)および実施例1の手順を利用して調製したが、フラグメント[Glu<sup>8</sup>-Lys<sup>2,2</sup>, Des-Ser<sup>2,3</sup>]Mag1-OCH<sub>2</sub>PAM樹脂の合成後、その約2/3を除去した。この合成の終了時点で、t-Boc基の除去後、622mgの[Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Des-Ser<sup>2,3</sup>]Mag

50

ートをパラフィルムで封止し、室温にて48時間インキュベートした。4Xおよび/または10Xの対物レンズを使用して顕微鏡により該真菌の成長を24および48時間後に観察した。胞子の発芽量および真菌の成長を、+および-系を使用して各観測時間における定量的測定値として記録した。[-]は発芽が生じなかったことを示し、[+]は膨張した発芽管を有する膨潤胞子を意味し、[++]は粗い格子の全体的な出現を伴う菌糸成長の初期を意味し、[+++]は厚い不透明な網模様の全体的な出現を伴う高密度の菌糸成長を意味する。次いで、各テストされたAMP PPのMCIC値を記録した。ここで、MCIC値とは胞子の発芽が生じないペプチドの最低の濃度(評価=[-])として定義される。表2には、処理後24時間において、テストした2または3種の植物病原性真菌の各々に対し、各AMP PPを使用した少なくとも3種の同型培養物から算出した平均のMCIC値( $\mu\text{g}/\text{ml}$ で表示)を掲載した。テストした植物病原性真菌はP3フサリウム(*Fusarium*) (野外で単離)、トリコデルマリーセイ(*Trichoderma reesei*) (イリノイ州、ペオリアのUSDA-ARSのDr. ジョンエリス(John Ellis)から入手)、セルコスボラ(*Cercospora*) sp. (デラウェア州、ニューワーク、デラウェア大学のDr. ジェームズホーク(James Hawk)から入手) およびヘルミントスボリウムカルボヌム(*Helminthosporium carbonum*)であった。

表2: MCIC値

	P3フサ リウム	トリコデル マリーセイ	セルコス ボラsp.	ヘルミントスボリ ウムカルボヌム
胞子数/テスト	$10^7$	$10^6$	$10^6$	$\cdot 10^5$ または $10^6$
<u>ペプチドNo.</u>				
Pep No. 1	19+/-5	35+/-6	29+/-5	20+/-0 - 30+/-0
Pep No. 2	18+/-5	35+/-6	20+/-0	15+/-6 -
Pep No. 3	20+/-0	20+/-0	45+/-6	20+/-0 -
Pep No. 4	60+/-0	67+/-6	Nd	70+/-0
Pep No. 5	57+/-5	Nd	Nd	85+/-0
Pep No. 6	37+/-9	Nd	Nd	Nd
Pep No. 7	30+/-0	40+/-0	35+/-6	35+/-6
Pep No. 8	38+/-5	38+/-5	68+/-21	65+/-6
Pep No. 9	15+/-6	24+/-12	25+/-10	63+/-29
Pep No. 13	15+/-6	13+/-5	26+/-6	37+/-15
Pep No. 15	98+/-5	73+/-5	Nd	150+/-0
Pep No. 16	65+/-6	50+/-8	Nd	90+/-0
Pep No. 18	98+/-5	88+/-5	Nd	150+/-0
Pep No. 19	35+/-7	75 (同型培養なし)	Nd	Nd

Nd = データなし。

テストした殆どのペプチドは低濃度( $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満)で4種の異なる病原体の成長を阻害する上で有効であった。該ペプチドの殆どは、真菌に対する活性とほぼ同程度にバクテリアEcc SR319 (以下参照) に対しても活性であった。しかし、ペプチドNo. 7、8、15および18はEcc SR319に対するよりも一層真菌に対して高い活

性を有していた。

#### 実施例 17：抗菌性バイオアッセイ

エルウイニアカロトボラカロトボラ (*Erwinia carotovora carotovora*) 菌株 SR319 (*Ecc* SR319) (ペンシルバニア州、フィラデルフィア USDA-ARS の Dr. C. H. リアオ (Liao) から入手) をルリアベルタニ (*Luria-Bertani* ("LB")) プロス寒天プレート上に塗布し、28℃にて一夜育成した。24 時間後、該寒天プレートから白金耳一杯分の *Ecc* SR319 を取り出し、栓付きの無菌の 10 ml 試験管内の LB プロス (溶液 1 l 当たり 10 g のバクトトリプトン、5 g のバクトイースト抽出物、および 10 g の塩化ナトリウムを含み、オートクレーブ処理して滅菌) 3 ml に添加した。この培養物を一夜育成した後、ダイナテック (*Dynatech*) MR600 マイクロプレートリーダー (バージニア州、アレクサンドリアのダイナテックラボラトリーズ社 (*Dynatech Laboratories, Inc.*)) を使用して 630 nm における光学密度を記録した。この一夜培養物の一部をルビアプロスで調整して 630 nm における光学密度 0.2 を有する培養物を得た。この培養物約 250  $\mu$ l を栓付きの無菌の 10 ml 試験管内のルビアプロス 2250  $\mu$ l に添加し、この希薄培養物を振盪インキュベータで 28℃にて三〜四時間、新たに育成した培養物の 630 nm における光学密度が 0.2 となるまで育成した。この中対数増殖期にある培養物の一部をルビアプロスで 1000 倍に希釈して、培養物 1 ml 当たりコロニー形成単位約  $10^5$  なるおよその濃度とした。この希薄培養物約 85  $\mu$ l を、単一の実験内の各 AMPPP に対して調製された 12 ウェルからなる 3 種の同型培養セットを有する 96 ウェルをもつマイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。各 AMPPP の原液は 1 mg/ml の濃度で調製し、各ペプチド原液 1~15  $\mu$ l を該マイクロタイタープレートの各ウェルに添加し、次いで十分な量の水を加えて全ウェル体積を 100  $\mu$ l とした。アッセイした典型的なペプチドの体積は 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 および 15  $\mu$ l であり、これらは 0~150  $\mu$ g/ml の範囲の最終ペプチド濃度に相当する。該マイクロタイタープレートをパラフィルムで封止し、振盪台上で 28℃にて 44 時間インキュベートした。各 *Ecc* SR319 培養ウェルの光学密度を 20 時間後、次いで 44 時間後に記録した。次に、最小完全阻害濃度 (MCIC) を、バクテリアの育成が観測されなかった種々のペプチド濃度を各同型培養セットに対して測定した、表 3 には、各 AMPPP について実施した少なくとも 3 回の同型培養実験から、処理の 20 時間後に観測した平均の MCIC 値 ( $\mu$ g/ml で表示) を掲載した。テストした AMPPP は実施例 1~5、7、9、10、12、14 および 15 に記載のように調製もしくは入手した。

表 3: M I C I 値

Pep No.1	50+/-5
Pep No.2	80+/-0
Pep No.3	5+/-0
Pep No.4	5+/-0
Pep No.5	17+/-6
Pep No.6	23+/-6
Pep No.7	>150
Pep No.8	>150
Pep No.9	33+/-5
Pep No.13	33+/-5
Pep No.15	>150
Pep No.16	30+/-0
Pep No.18	>150
Pep No.19	30+/-10

10

20

ペプチドNo. 7、8、15及び18を除き、テストしたペプチドの殆ど全てがEcc SR319の成長抑制において有効であった。先の4種のペプチドは1ml当たりペプチド150 $\mu$ gよりも高い濃度においてさえEcc SR319に対して活性ではなかった。ペプチドNo. 5、6、9及び16は、1ml当たり同じ $\mu$ gの量でテストした場合に、元のモノマー（ペプチドNo. 1、2、4及び12）の活性よりも少くとも良好な活性を示した。

#### 実施例18: 植物毒性に対する酸素発生バイオアッセイ

酸素電極において使用する葉緑素の調製用の以下の方法はグプタ (Gupta) 等のPlant Physiol., 1989, 89, pp. 735-761に記載の「葉緑素被膜-結合Mg<sup>2+</sup>の測定アッセイとしてのクロロテトラサイクリン蛍光の発展と利用 (Development and Use of Chlorotetracycline Fluorescence as a Measurement Assay of Chloroplast Envelope-Bound Mg<sup>2+</sup>)」と題する論文に記載のものと同様である。ハウレン草 (スピナシアオレラセア (spinacea oleacea) L. var. "メロディー (Melody)") を育成チャンバー内で1:1ビート/ひる石注封混合物中で10時間明所にて育成した。このチャンバーの温度は該育成期間を通して日中は21℃に、また夜は16℃に維持した。全ての植物は6~8週の育成後葉緑素の単離に利用した。

葉緑素に富む画分を得るために、約12gの葉脈を除いたハウレン草の葉を十分に洗浄し、表面を乾燥させた。次に、この葉を各々約1/2インチ平方の小片に細断し、50mlの冷却したホモジネーション用媒体 (0.33Mのソルビトール、50mMのヘ pes) -NaOH、pH6.8、2mMのNa<sub>2</sub>EDTA、1mMのMnCl<sub>2</sub> および1mMのMgCl<sub>2</sub>) を含む小さなブレンダージャーに入れた。該組織をブレンダー中で高速で3秒の間隔で2度混合した。得られたホモジネートを4層のチーズクロスおよび2層のミラクロス (miracloth; カリフォルニア州、ラジョラのベリングダイアグノスティックス (Behring Diagnostics)) を通して濾過し、これを2個の冷却した30mlのガラス製遠心管に導いた。この濾過した溶液を、ベックマン (Beckman) J2-21M遠心機 (ニュージャージー州、ソマーセットのベックマンインストルメンツ社 (Beckman Instruments, Inc.) 内のス

50

イングローター中で750 g (2, 200 RPM) にて1.0分遠心処理した。次に、得られた上澄をデカンテーションし、0で攪拌してペレットを穏やかに再懸濁させた。約15 ml のホモジネート用媒体を葉緑素の各試験管に添加し、次いで該葉緑素を30 ml のガラス製遠心管内の40%パーコール勾配 (6 ml の Percoll, 9 ml のホモジネート用媒体および0.039の牛血清アルブミン) 上に層状にのせた。これらの遠心管をベックマン J 2-21M 遠心機内のスイングローター中で2500 g (4, 000 RPM) にて4.0分遠心処理した。上澄を取り出し、生成ペレットを少量のホモジネート用媒体 (約500  $\mu$ l) 中に再懸濁した。

プラスチド濃度は、一般にクロロフィルを基にして表示した。クロロフィルはアーノン (Arnon) の Plant Physiol., 1949, 24, pp. 1-15 に記載の「単離クロロプラストにおける銅酵素、 $\beta$ -ブルガリス中のポリフェノールオキシダーゼ (Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts, Polyphenol Oxidase in Beta Vulgaris)」と題する文献中の方法により測定される。約50  $\mu$ l のクロロプラスト原懸濁液を10 ml の80%アセトンに添加し、この溶液を5分間暗所でインキュベートし、次いでベックマン GP 遠心機で500 g (1630 RPM) にて5.0分間遠心処理した。このアセトン-クロロプラスト溶液の吸光度を645 nm、663 nm および730 nm で追跡した。次に、クロロフィル濃度を10X [(645 nmにおける吸光度 $\times$ 20.2) + (663 nmにおける吸光度 $\times$ 8.02) - (730 nmにおけるバックグラウンド)] として計算した。これは、元の50  $\mu$ l のクロロプラストに対する $\mu$ gで表したクロロフィルの量を与えた。このクロロプラストの濃度を、次にホモジネート用媒体で調整し、50 ml の懸濁液が26  $\mu$ gのクロロフィルを含有するようにした。これらのクロロプラストは1-1/2~2時間に渡り活性であるにすぎないので、即座に使用した。

酸素電極 (イングラッド、ノーホーク、キングズリンのハンザテックインストルメンツ (Hansatech Instruments) 製) を使用して、単離されたクロロプラストの酸素発生を測定した。この方法の詳しい議論についてはD. ウォーカー (Walker) の「光合成の簡単な測定における酸素電極および蛍光プローブの利用 (The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis)」と題する上記の文献を参照のこと。飽和KCl溶液を該電極のウエルに入れ、1インチ平方の圧延紙またはレンズ紙を、該紙がKClを吸収し、かつイオンブリッジを形成するように該電極ウエルに設置した。表面に触れないように注意して、1インチ平方のテフロン膜を調製し、該浸漬紙を覆うように配置した。膜アプリケーションを使用して、Oリングを該電極の頂部上に配置し、かくして紙と膜とが該電極を確実に横切るようにした。CB-1D制御箱に通電して、該系を約1時間ウォームアップした後校正した。この系の温度は循環水浴で20℃に維持した。次いで、この系を空気で飽和した水中の酸素濃度が267 nM/mlであると仮定して、脱イオン水の激しく攪拌した洗浄ビンからの空気で飽和した水を使用して校正した。ゲインスイッチを使用して、後に出力をチャートレコーダのペンが最大チャート高さとなるように設定した。該容器中の水から全ての空気を除去し、かつ該チャートレコーダの0設定を実施するために、約2~3 mgのナトリウムジチオナイトを添加し、該プロットペンをグラフの底部分にまで移動するか否かを観察した。線の傾きが不安定な場合には、該膜および紙を取り外して該酸素電極の設定を再度行う。

この酸素電極を使用して植物毒性のバイオアッセイを実施するために、該酸素電極容器に以下の成分を加えた。即ち、830  $\mu$ lのアッセイ媒体 (25 mMの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ を添加したpH 7.6に調整したホモジネート用媒体)、50  $\mu$ lの0.1 Mの新鮮な $\text{NaHCO}_3$ 、20  $\mu$ lのカタラーゼ (全体で49.6単位/ $\mu$ l) および50  $\mu$ lのクロロプラスト懸濁液 (最後に添加)。次に、該電極用の光源を点灯した。初期誘導期は平衡化されたクロロプラスト系であるとした。この初期誘導期が1分以上である場合には、クロロプラスト単離に使用した該植物は不十分であると判定された。酸素発生性の実験において



は、定常的な酸素発生速度が3～4分で達成された。次いで、50  $\mu$ l のペプチド含有溶液をハミルトン (H a m i l t o n) 注射器を使用して添加した。酸素発生速度はペプチド添加3分後に監視した。ペプチド添加後のこれらの実験における酸素発生速度の低下は、該ペプチド添加前の該チャートレコーダ出力線の勾配と、該ペプチド添加後の設定点における該線の勾配と比較することにより決定した。得られた結果をクロロフィル含有量に対して規格化した。というのは、実験間でクロロプラスト濃度に幾分差があったからである。これらの速度は1時間当たり、クロロフィル1mg当たりの酸素の $\mu$ Mとして表した。最終結果を酸素発生の阻害率(%)で表示した。該阻害率は、該ペプチド添加後の酸素発生速度を、酸素発生の初期のコントロール速度で割り、100を掛け、更に100%から得られた%を引くことにより導かれる。

10

表4には、最終濃度8  $\mu$ Mでペプチドに暴露したクロロプラストに対して、いくつかのAMP PPに見られた結果をまとめた。該ペプチドは実施例1～5、7、9、10、12、14および15に記載の如くして調製もしくは入手した。平均値および標準偏差を、各AMP PPについて実施した8～10回の同型培養アッセイから算出した。コントロール酸素発生速度は72～283  $\mu$ M O<sub>2</sub>/クロロフィル時/mgの範囲内であった。結果における日々の変動を最小化するために各実験では多数のペプチドの実験を実施した。

**表 4 : 酸素発生の%阻害率**

Pep No. 1	70+/-18
Pep No. 2	12+/-16
Pep No. 3	100+/- 0
Pep No. 4	5+/- 6
Pep No. 5	100+/- 0
Pep No. 6	100+/- 0
Pep No. 7	39+/-30
Pep No. 8	5+/- 6
Pep No. 9	100+/- 0
Pep No. 13	100+/- 0
Pep No. 15	100+/- 0
Pep No. 16	100+/- 0
Pep No. 18	3+/- 5
Pep No. 19	67+/-13

20

30

種々のペプチドにより、広範囲に渡る酸素発生の%阻害率が観測された。特にペプチドNo. 3、5、6、9、13、15および16は全て、該実験を実施した各時点における酸素発生の100%阻害を生じた。対照的に、ペプチドNo. 8、即ち逆マガイニン2 (r e v e r s e M a g a i n i n 2) は天然のマガイニン2と比較して極めて低い植物毒性作用を示した。マガイニン2の配向の逆転は、抗真菌活性を維持するが、抗菌活性を失わせる(即ち、ペプチドNo. 1に対して、ペプチドNo. 8の植物毒性を実質的に減じる)。本特許に包含される実施例に記載したように、このペプチドと他のペプチドとの結合は協働的な抗真菌活性および抗菌活性とを有するが単一のペプチド単独よりもずっと低い植物毒性を有する混合体を与えることができた。

40

#### 実施例19：全細胞植物性スクリーニング技術

トウモロコシBMS懸濁細胞による酸素消費を、抗生物質ペプチドの相対的な植物毒性の指標として測定した。ブラックメキシカンスイート(BMS)細胞懸濁培養物の維持は、25mlの該細胞培養物を、培養開始3日後に栓付無菌250ml三角フラスコ中の25

50

mlの新鮮なMSA2D培地（ムラシゲ&スコーグ（Murashige and Skoog）基本塩混合物、カタログNo. M5524の4.4gボトル、100mgのmyo-イノシトール150mgのレーアスパラギン、30gのスクロース、20mlの0.1mg/ml 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸原液および、25mg/100mlのパント酸カルシウムと、50mg/100mlのピリドキシンと、50mg/100mlのニコチン酸と、50mg/100mlのチアミンと、200mg/100mlのグリシンとを含む1mlのビタミン原液（該成分を全て滅菌した蒸溜水1lに添加し、次いで25分121℃にてオートクレーブ処理して得られる）に移すことにより行った。4日後に、該細胞培養物の12.5mlを新鮮なMSA2D培地35.5mlに移した。移動管理期間を3～4日に変えることにより、培養物を連続的に維持した。この培養物を弱い光の下で室温にて125RPMにて振塗した。酸素消費実験のために、細胞を新鮮な培地に移してから1日後に使用した、細胞を滅菌した50mlの遠心管に注ぎ、重力により沈降させた。使用済の培地を取り出して7.8mlの新鮮なMSA2D培地を該沈降細胞1gにつき添加した。この細胞原液を連続的な通気のために振盪機に設置し、当日に実施した全てのアッセイで使用した。

酸素電極（イングランド、ノーホーク、キングズリンのハンザテックリミテッド（Hansatech Limited））を腐食がないか否かについて検査した。次いで、飽和KCl溶液を清浄な電極ウエルに入れた。1インチ平方の圧延紙またはレンズ紙を切り出し、該紙の端部がKClを吸収しイオンブリッジを形成するように該ウエル上に配置した。表面に触れないように注意して1インチ平方のテフロン膜を切り出し、浸漬した圧延紙上に設置した。膜アプリケーションを使用して、Oリングを該電極の頂部上に圧接し、かくして紙と膜とが該電極を確実に横切るようにした。CB-1D制御箱（ハンザテックリミテッド（Hansatech Limited））に通電して、該系を約1時間ウォームアップした後校正した。このCB-1D制御箱の出力を1Xに設定した。チャートレコーダをチャート速度3cm/minとなるようにその入力を0.05Vに設定した。20℃に維持した循環水浴を該電極チャンバーに取りつけた。次いで、この系全体を、蒸溜水を含む洗浄ビンで激しく攪拌して得た空気中で飽和した水を使用して校正した。ゲインスイッチを使用して、出力をチャートレコーダのペンが最大チャート高さ（900＝頂部）となるように設定した。空気中で飽和した水中の酸素濃度は20℃にて276nM/mlであると仮定した。約2～3mgのナトリウムジチオナイトを添加することにより、該容器中の水から全ての空気を除去した。該チャートレコーダのペンをグラフの底部分にまで移動することにより応答させた。線の傾きが不安定な場合には、該膜および紙を取り外して該酸素電極の設定を再度行う。

1mlのアッセイに対して、該酸素電極容器に888μlの水と62.5μlのBMS原細胞懸濁液とを添加した。このアッセイで使用する細胞の最終濃度は約8mg/mlであった。該細胞による酸素消費速度は該チャートレコーダで3分間追跡した。次に、ペプチド50μlをハミルトン注射器を使用して該容器に添加した。（ペプチド原液は50μl中に所定の濃度を放出するように調節した）。酸素消費はペプチドの添加後5分にて追跡した。完全なテストに必要な時間は8分であった。

ペプチドの添加後酸素消費の抑止時間は、ペプチド添加前のグラフ上の線の傾きを、ペプチド添加後の設定点におけるグラフ上の線の傾きとを比較することにより決定した。該ペプチドの添加後の酸素消費速度を、酸素消費の初期コントロール速度で割り、次いで100を掛けた。次に、この%を100%から差引き、酸素消費の%阻害率として表された最終の結果を得た。

平均値および標準偏差を、各AMP PPを使用して実施した4～5個の同型培養アッセイから算出した。テストしたAMP PPは実施例1、4、および14に記載のようにして調製もしくは入手した。結果を表5に示す。

表5: 4  $\mu$ l のペプチドの添加により引き起こされる

## 酸素消費の%阻害率

Pep No. 1	65+/- 6
Pep No. 2	52+/- 6
Pep No. 4	59+/- 6
Pep No. 5	72+/-13
Pep No. 8	16+/-12

10

ペプチドNo. 1は、逆ペプチドNo. 8と比較して、より高い酸素消費の阻害率を生じた。この結果は、ペプチドNo. 1の配向の逆転がクロロプラストの酸素発生に及ぼす植物毒性を実質的に減じることを示した前の実施例（実施例18の表4を参照のこと）と一致している。ペプチドNo. 2およびペプチドNo. 4に対する結果は単離されたクロロプラストに及ぼす比較的低い植物毒性作用（実施例18の表4を参照）と比較して、全細胞に及ぼすより大きな全体的な植物毒性が存在することを示している。この結果は驚く程のことではない。というのは、全細胞はより複雑であり、多数の代謝経路を有し、該経路がペプチドに影響される可能性があるからである。ペプチドNo. 1のモノマーを含むオリゴペプチドであるペプチドNo. 5は該元のモノマーと比較してそれほど違った植物毒性に及ぼす作用をもたなかった。

20

## 実施例20: 蛋白分解劣化に対する耐性の測定

ペプチドの細胞外植物プロテアーゼに対する感受性を測定するために、およびこれらのプロテアーゼによるプロセッシングサイトを決定するために、ある系を設計して、トウモロコシ、タバコまたはジャガイモの葉から細胞外流体を得、またこれらを種々のペプチドの安定性のテストのために使用した。

タバコの葉を脱イオン水で洗浄した後、該葉から葉脈間部分を細断することにより細胞外流体（ECF）を得た。該セグメントを真空デシケータ中で水に浸し、5～10分間真空を印加した。真空を徐々に解除して、該葉を拭き取って乾燥し、4～5片を巻いて、50 mlの使い捨て用の注射器バレル（スイング遠心ローターに合うように切断されている）の中に入れた。この注射器バレルを50 mlのネジキャップ式の円錐形遠心管に入れ、60 30

0 x gにて30分間スイングローター内で遠心処理した。液体を回収し、微小遠心器で10分遠心処理した。上澄を-80℃で保存し、後の実験で使用した。

ペプチドの細胞外植物プロテアーゼに対する安定性をテストするために、10  $\mu$ gのペプチド（1mg/ml）を、pH7.4の50mM Tris-HCl緩衝液中で10%の細胞外液と共にインキュベートした。テストしたペプチドは実施例6、13および14に記載の如く調製もしくは入手した。37℃にて、0、15、30、45および60分間インキュベートした後、該プロテアーゼをトリフルオロ酢酸（TFA）を添加して最終濃度1%（v/v）とすることにより不活性化した。ペプチドを、ヒューレットパッカード（Hewlett-Packard）HP1090高圧液体クロマトグラフ（ペンシルバニア州、アボンドールのヒューレットパッカード（Hewlett-Packard））上で 40

0.1% TFA中で5～35%アセトニトリル勾配を使用し、3.51 ml/minにて、2.1 x 30 mmのPOROS R/Hカラム（マサチューセッツ州、ケンブリッジのパーспекティブバイオシステムズ（Perspective Biosystems））上での逆相クロマトグラフィーにより分析した。ECFとのインキュベーション時間を増大すると、2つの初期溶出ピークが親ピークから生成されることが観測される。表6の結果は親ピークの消失速度を示し、従って蛋白分解劣化に対する相対的な耐性を示す。該親のピーク高さの減少速度が遅ければ遅い程、劣化の速度は遅いことを示す。

表 6 : 親ピーク下部の面積の割合

時間	0	15	30	45	60
ペプチドNo.					
1	100	23	18	5.3	0.5
11	100	95	92	82	73
12	100	115	107	111	102

実施例 2 1 : E. コリ中で合成遺伝子を分泌および樹立可能なペプチド遺伝子の構築

分泌可能な合成遺伝子を、普遍的な遺伝子コード、また標的シグナルペプチド配列とは異なる該合成遺伝子の部分に対しては、ゲンバンク (Genbank) (cf. D. M. パッシュ (Bash) & J. P. マスカレンハス (Mascarenhas), *Maize Gen. Coop. Newsletter*, 1989, 63, pp. 4-5) における記載から収集したトウモロコシコドン利用表に基づいて設計した。この遺伝子はニンジンエクステンシン遺伝子を含み、これは該細胞外空間に対して該エクステンシンタンパクを標的とし (J. チェン (Chen) および J. E. バーナー (Varner), *EMBO J.*, 1985, 4, PP. 2145-2151)、Nco I 制限エンドヌクレアーゼ認識サイトを含む DNA 配列を介してペプチド No. 12、Met- (SEQ ID No. 20) をコードする配列に結合されている。該 Nco I 認識サイトの存在はニンジンエクステンシンシグナルペプチドとペプチド No. 12 との間に Ala 残基を付加する。該 Met- (SEQ ID No. 20) をコードする合成 AMPPP 遺伝子部分は、近接 (flanking) の非等価な Nco I および植物遺伝子発現調節シグナルを含む任意のプラスミドベクターに有利に装入するめたの Pst I 認識配列をもつように設計された。該合成 AMPPP 遺伝子部分は、モデル 391 PCR-MATE 自動化オリゴヌクレオチド合成装置 (カリフォルニア州、フォスターシティーのアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) で化学的に合成された 2 個の合成オリゴヌクレオチドから調製され、(SEQ ID No. 24) および (SEQ ID No. 25) の構造を有していた。これらの遺伝子部分は製造業者等の指示に従って精製した。

各精製したオリゴヌクレオチド約 500 ng を 9  $\mu$ l 容量の溶液中で混合し、そこに 1  $\mu$ l の 10X リンカー/キナーゼ緩衝液を添加した (T. マニアティス (Maniatis) 等の *Molecular Cloning*, p. 396; コールドスプリングハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory), コールドスプリングハーバー、NY、1982 を参照のこと)。この混合物を 15 分間 80℃ に加熱し、次いで 200-300 ml の水中で徐々に室温まで冷却した。次に、この混合物を更に 60 分かけて、冷蔵庫に入れることにより 4℃ まで冷却した。

アニール処理した合成 AMPPP 遺伝子がクローニングされ、かつ正確な配向で付加すべき植物遺伝子発現調節シグナルを含むプラスミドベクターを、該プラスミド DEPGUSO (エニモントアメリカ社 (EniMont America Inc.) の J. コッツィトリート (Cozzitorto) から入手) を制限酵素 Nco I および Pst I (マサチューセッツ州、ベバリーのニューイングランドバイオラプス (New England Biolabs)) で切断することにより調製した。

このプラスミド DEPGUSO は広く利用されるプラスミド pUC19 (C. ヤニッシュペロン (Yanisch-Péron) 等、*Gene*, 1985, 33, pp. 103-119) にクローニングされた種々の DNA セグメントを含んでいる。これらの DNA インサートは、該 pUC19 ポリリンカー中の EcoRI 制限エンドヌクレアーゼ認識サイトから順に Hind III 認識サイトまで読むと、DNA の約 560 塩基対のものであり、該 DNA はカリフラワーモザイクウイルス (ストラスブルグ株) からの 355 の転写開始サイトを包囲し、該サイトは主転写開始サイト、即ち XbaI に近接する合成 DNA セグメントおよび Nco I 認識サイトに関して +129 にある DdeI 認識サイトで終

端しており、また該DNAはニンジンエクステンシン遺伝子の32アミノ酸リーダーペプチド配列をコードし(J. チェンおよびJ. E. バーナーの上記文献)、その後には追加Ala残基用のコドン、E. コリβ-グルクロニダーゼ(GUS)(E. C. 3. 2. 1. 31)用のDNAコード配列、約50塩基対のトランスポゾンTn5由来のnptII遺伝子の非機能部分、およびアグロバクテリウムツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)由来のTiプラスミド(H. デグレーベ(DeGrove)等, J. of Mol. Appl. Gen., 1982, 1, pp. 499-511)からのT-DNAのオクトパインシンターゼからのポリアデニル化サイトを結合するPvuIIフラグメント由来の約700塩基対のDNAがある。

DEPGUSOのNcoIおよびPstI酵素による消化は該GUS遺伝子を遊離し、かつ親ベクタを生じ、該親ベクタ内では、植物細胞中に分泌しようとするペプチドまたはタンパク融合生成物として発現すべき適当な読み取り枠内に遺伝子を直接クローニングできる。該プラスミドDEPGUSOは37℃にて90分間、4μgのDNA、8UのNcoI酵素および20UのPstI酵素を含む全体積15μlの1XKGB緩衝液(M. マックレランド(McClelland)等, Nucleic Acids Res., 1986, 16, p. 364)中で消化され、かつ生成するDNAフラグメントを1X TAE緩衝液の0. 8%アガロースゲル上でゲル電気泳動することにより分離した(T. マニアティス等、上記文献、p. 156)。

大きなDNAフラグメントをメスで切断し、15μlの蒸留水中に該大きなDNAフラグメントを再分散する前に、ジーン・クリーン(Gene-Clean; Bio101、ラジョラ、カリフォルニア州)で精製した。該大きなDNAフラグメント4μl(即ち、約500ngのDNA)を、1Xリガーゼ緩衝液および600UT4 DNAリガーゼ(マサチューセッツ州、' ビバリーのニューイングランドバイオラプス(New England Biolabs))を含む全体積25μl中で、アニールした合成AMPP P遺伝子DNA O、0. 5または1. 5μlと混合した。これらの混合物を15℃にて一夜インキュベートした。

次に、各連結混合物5μlを100μlの受容能のあるE. コリ菌株DH5α細胞(メリーランド州、ガイザースブルグのギブコBRL、ライフテクノロジーズ社(GIBCO BRL, Life Technologies Inc.))に添加し、該形質転換混合物をそれぞれ氷上で40分インキュベートした。次いで、この混合物に42℃にて60秒熱ショックを与え、氷上で2分間インキュベートし、次いで500μlのSOC培地(T. マニアティス等, Molecular Cloning (第2版), p. A. 2; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)を添加した後、37℃にて45分間保存した。次に、この形質転換した細胞を素早く遠沈させ、各細胞ペレットを500μlのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、p. A. 1)中に再懸濁した。

各形質転換細胞懸濁液の3種の100μl部分を、100μg/mlのアンピシリンを含有する新たなLB寒天プレート上に設置し、該プレートを37℃にて一夜インキュベートした。

適当なプラスミド構築体(この構築体をDEPMYP300と呼ぶ)を含有する形質転換したE. コリクローンを、制限酵素地図および50μg/mlのアンピシリンを含有する5mlのLBブロス(T. マニアティス等、上記文献、pp. 1. 25-1. 28)中で37℃にて一夜育成した各コロニーからミニプレブ(mini-prep)法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。植物発現ベクターDEPMYP300 DNAは付随的な変更なしに、形質転換法、例えば標的細胞中に直接形質転換DNAを装入するエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、またはマイクロプロジェクトイル衝撃法などを使用して、植物形質転換に利用できる。分化全能性の胚形成細胞のかかる形質転換は再現性のある植物を与えることができる。上記の如き直接形質転換法は、容易に形質転換されない作物種、例えば単子葉栽培穀物の培養された胚形成細胞に対して価値がある。

実施例 22: 合成 AMPPP Met- (Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup> マガイニン 1) 2 ダイマー遺伝子、該合成遺伝子の E. コリ中での樹立および合成 AMPPP 遺伝子の制限発現

合成 AMPPP Met- ([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>] マガイニン 1) 2 ダイマー遺伝子を、普遍的遺伝子コードに基づきおよびグラム陰性バクテリア E. コリ中での制限発現可能な市販品として入手できるバクテリアプラスミド pKK233-2 (LKB / ファルマーシア社 (Pharmacia Inc. )、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) のポリリンカー領域に直接装入するのに有利な近接の非等価な Nco I および Pst I 認識配列をもつように設計した。該合成 AMPPP ダイマー遺伝子の制限発現は、Met- ([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>] マガイニン 1) 2 の毒性活性のために該宿主細胞の成長に及ぼす有害な影響を防止するために望ましい。この合成遺伝子は、このペプチドの発現を可能とする第一のコドンとしての ATG を E. コリの適当な菌株に導入する。この合成遺伝子部分は、モデル 391 PCR-MATE 自動化オリゴヌクレオチド合成装置 (カリフォルニア州、フォスターシティのアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems)) 上で化学的に合成された構造 (SEQ ID No. 26) および (SEQ ID No. 27) を有する 2 種の合成オリゴヌクレオチドから調製され、また製造業者の指示に従って精製されるであろう。

精製した各オリゴヌクレオチド約 1~3  $\mu$ g を、1  $\mu$ l の 10X リンカー・キナーゼ緩衝液を添加した 9  $\mu$ l の溶液内で混合した (T. マニアティス等, Molecular Cloning, p. 396; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1982)。この混合物を 85℃ にて 15 分間加熱し、次いで 200-300 ml の水中で 3 時間に渡り徐々に室温まで冷却した。次に、該混合物を冷蔵庫に入れて 4℃ にて 60 分間更に冷却した。プラスミド pKK233-2 の 5  $\mu$ g を、製造業者の指示に従ってもしくは公知の方法で、全体積 15  $\mu$ l 中で制限酵素 Nco I および Pst I (マサチューセッツ州、ビバリーのニューイングランドバイオラプズ) で完全に消化した。T. マニアティス等の上記文献、Molecular Cloning, pp. 98-106 参照。

次いで、2  $\mu$ l の 5M 酢酸アンモニウムと 70  $\mu$ l の 100% エタノール (-20℃) とを水性反応混合物に添加し、該試料を 10 分間 -20℃ で保存した後、4℃ にて 30 分間 エッペンドルフの小型遠心機で遠心処理した。上澄を捨て、ペレットを真空下で 3~5 分間乾燥した。次に、この乾燥したペレットを 10  $\mu$ l の滅菌蒸留水に再懸濁し、この全試料を、1X TBE 緩衝液 (89 mM の Tris-OH、89 mM の硼酸、pH 8.3、2.5 mM の Na<sub>2</sub>EDTA) 中に 1  $\mu$ g/ml のエチジウムブロミドを含む 0.8% のアガロースゲル中で電気泳動した。

全長に渡り線状の pKK233-2 プラスミド DNA を長波長 UV 光の照射下で可視化させ、該線状 DNA のバンドをレーザーカミソリで該ゲルから切り出した。精製した線状プラスミド DNA を、製造業者の指示に従って、あるいは同様な方法、例えばサイズ排除クロマトグラフィーにより、ジーン・クリーン (Gene-Clean; カリフォルニア州、ラジョラの Bio101) を利用してこの試料から得た。T. マニアティス等の上記文献、Molecular Cloning, pp. 464-467 参照。

線状 pKK233-2 プラスミド DNA およびアニールしたオリゴヌクレオチドは、16  $\mu$ l の DNA 水溶液を含む溶液中の少なくとも 0.5  $\mu$ g の pKK233-2 DNA を使用して 1:3-1:10 の範囲の比率で混合される。次いで、2  $\mu$ l の 10X リガーゼ緩衝液 (マサチューセッツ州、ビバリーのニューイングランドバイオラプズ) および 2  $\mu$ l の T4 DNA リガーゼ (マサチューセッツ州、ビバリーのニューイングランドバイオラプズ; 400 U/ $\mu$ l) を添加した。この連結反応混合物を 14~15℃ にて一夜インキュベートした。

受容性の E. コリ菌株 IG109 細胞 (I. ゴールドバーグ (Goldberg) 等の「E. コリ中のコラーゲン類似体-コード合成遺伝子のクローニングおよび発現 (Cloning and expression of a collagen-analog

-encoding synthetic gene in *E. coli*)」と題する論文、Gene, 1989、80、pp. 305-314)を公知の手段で調製した(T. マニアティス等、上記文献、pp. 250参照)。このE. コリ菌株を使用した。というのは、これが菌株の維持中に該合成AMPPP遺伝子との相互遺伝子欠落を最小化するのに役立つ好ましい遺伝的性質を有するからである。該連結反応混合物の2 $\mu$ lを氷上で100 $\mu$ lの受容性細胞と混合し、得られる混合物を氷上で30~60分間放置した。次に、この形質転換混合物を42℃にて60秒間加熱し、氷上で更に2分間冷却し、次に500 $\mu$ lのSOC培地(T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版)、p. A. 2; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)を添加した後、37℃にて45分間保存した。次に、この形質転換した細胞を遠沈させ、各細胞ペレットを500 $\mu$ lのLBプロス(T. マニアティス等、上記文献、p. A. 1)中に再懸濁した。各形質転換細胞懸濁液の3種の100 $\mu$ l部分を、100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含有する新たなLB寒天プレート上に設置し、該プレートを37℃にて一夜インキュベートした。適当なプラスミド構築体(この構築体をDEPMYP300と呼ぶ)を含有する形質転換したE. コリクローンを、制限酵素地図および50 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含有する5mlのLBプロス(T. マニアティス等、上記文献、pp. 1. 25-1. 28)中で37℃にて一夜育成した各コロニーからミニプレブ(mini-prep)法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。

該合成[(f) Met<sup>-</sup>([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>] マガイニン1)2]遺伝子の制御発現は組み換えバクテリアクローンを30~37℃にて醗酵させ、2~60分間42℃に該培養物の温度を上昇することにより達成される。該培養物の温度を次に37℃にて30~90分間低下して、該細胞を収穫できた。このバクテリア細胞ペーストを次にフレンチプレスに通し、該[(f) Met<sup>-</sup>([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>] マガイニン1)2]タンパクを公知の手段により精製できた。例えば、F. M. アンスベル(Ansubel)等編のカレントプロトコールズインMol. Boil.の第16章、ウィリーインターサイエンス、1988を参照のこと。また、[(f) Met<sup>-</sup>([Arg<sup>7</sup>, Glu<sup>8</sup>, Pro<sup>2,3</sup>] マガイニン1)2]に富む該バクテリア細胞ペーストを、植物病原体の感染またはコロニー形成の遅延もしくは排除の目的で、一般に植物組織に直接AMPPP遺伝子生成物またはAMPPPを放出させるために、本発明の範囲内において実施される方法の何れかにおいて利用できる。

#### 実施例23: AMPPP遺伝子含有植物発現カセットの組み換えTiプラスミドへのサブクロニングおよびアグロバクテリウムツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)内での樹立

オクトパインシンターゼ転写ターミネータによりカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータから該DNA領域を形成するDEPMYP300中に含まれる該植物発現カセットを、多数の双子葉作物種の植物組織を形質転換できるアグロバクテリウムツメファシエンス中の組み換えTiプラスミドを樹立するという最終目的のために、非武装化(disarmed)バイナリーTiプラスミドにサブクロニングした。該植物発現遺伝子カセットDEPMYP300中におけるコドンの利用を、トウモロコシ植物中での発現に対して最適化したが、このカセットにおけるコドン利用は、GCGソフトウェア解析プログラムコドンフリークエンシー(Codon Frequency)(J. デベルー(Deveraux)等のNucleic Acids Res., 1984、12、pp. 387-395を参照)を使用した検索により判断されるように、タバコ等のある種の双子葉植物における発現にも利用できる。約1.3 $\mu$ gのDEPMYP300 DNAを37℃にて2時間27 UのBamH1制限酵素(ウイスコンシン州、マジソンのプロメガ社(Promega Corporation))により、1.2 $\mu$ lの10X BamH1緩衝液(ウイスコンシン州、マジソンのプロメガ社)を含む全体積12 $\mu$ lの溶液中で消化した。次に、消化したDNAを1X TAE緩衝液(T. マニアティス等、上記文献、p. 156)中の0.8%のアガロースゲル中で電気泳動した。小さなDNAフラグメントをメス



で切断し、製造業者の指示に従ってジーン・クリーン (Gene-Clean; カリフォルニア州、ラジョラの Biolo) で精製し、次いで蒸留水  $15 \mu\text{l}$  中に大きな DNA フラグメントを再懸濁した。

非武装化したアグロバクテリウム ツメファシエンス Ti プラスミド pBin19B (D. トロリンジャー (Trollinger)、エニモントアメリカ社 (EniMont America Inc.) より入手) の約  $1.0 \text{mg}$  を、DEPMYP300 DNA の消化につき上記した如き条件下で制限酵素 BamH1 で同時に消化した。Iac ポリリンカーの一部の除去を除けば、このプラスミド pBin19B は Ti プラスミド pBin19B と同一であり (M. ベバン (Bevan), Nucleic Acids Res., 1984, 12, pp. 8711-8721)、該ポリリンカー部分は、それにもかかわ  
10  
らず該ポリリンカーの固有の BamH1 および EcoR1 制限エンドヌクレアーゼ認識配列を残している。該 BamH1 一切断 pBin19B は、標準的方法 (cf. F. M. アンズベル (Ansubel) 等編のカレントプロトコールズ イン Mol. Boil. の 2. 1. 1 章、ジョンウィリー & サンズ、ニューヨーク、NY, 1989 を参照) によりフェノール抽出され、エタノール沈殿され、その後蒸留水  $10 \mu\text{l}$  中に再懸濁された。

次いで、酵素連結反応を、3 U T4 DNA リガーゼ (ウィスコンシン州、マジソンのプロメガ社 (Promega Corporation)) および 1X リガーゼ緩衝液 (最終濃度; ウィスコンシン州、マジソンのプロメガ社 (Promega Corporation)) を含む全体積  $10 \mu\text{l}$  の溶液中で、 $0.7 \mu\text{l}$  の BamH1 一切断 pBin19B DNA および DEPMYP300 のより小さな BamH1 フラグメント  $3.0 \mu\text{l}$   
20  
について実施した。

この連結試料を室温にて 2 時間インキュベートし、次いで  $2.0 \mu\text{l}$  の該連結混合物を、氷上で、 $35 \mu\text{l}$  の受容性 E. コリ菌株 DH5 $\alpha$  に添加した。この形質転換混合物を氷上で 45 分間維持し、次いで  $42^\circ\text{C}$  にて 60 秒間熱ショックを与え、かつ再度氷上で 2 分間冷却した。後に、 $500 \mu\text{l}$  の SOC 培地 (T. マニアティス等、Molecular Cloning (第 2 版), p. A. 2; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989) を添加した後、この混合物を  $37^\circ\text{C}$  にて 45 分間保存した。

各形質転換細胞懸濁液の 3 種の  $100 \mu\text{l}$  部分を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含有する新たな LB 寒天プレート上に設置し、該プレートを  $37^\circ\text{C}$  にて一夜インキュベートした。適当なプラスミド構築体 (この構築体を DEPMYP300/Bin19B と呼ぶ) を含有する形質転換した E. コリクローンを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含有する 5 ml の LB プロス (T. マニアティス等、上記文献、pp. 1.25-1.28) 中で  $37^\circ\text{C}$  にて一夜育成した各コロニーからミニプレプ (mini-prep) 法により単離したプラスミド DNA の DNA の制限酵素地図により同定した。アグロバクテリウム ツメ  
30  
ファシエンス菌株 LBA4404 (J. ウィリス (Willis)、エニモントアメリカ社より入手) の培養物  $5.0 \text{ml}$  を、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシンを含む YEB 培地 (G. アン (An) 等の植物分子生物学マニュアル (Plant Molecular Biology Manual)、クルワーアカデミック社 (Kluwer Academic Publishers)、マサチューセッツ州、ボストン、1990 を参  
40  
照) 中で一夜育成した。該菌株 LBA4404 は形質転換 T DNA セグメントの欠落する Ti プラスミドを含む (A. ヘケマ (Hoekema) 等、Nature, 1983, 303, pp. 179-181)。次いで、これらの細胞を YEB 培地中で 100 倍に濃縮し、DEPMYP3/Bin19B DNA の  $1 \sim 2 \mu\text{g}$  を氷上で  $200 \mu\text{l}$  の受容性細胞と混合する。この混合物を液体窒素中で 5 分間凍結し、次いで  $37^\circ\text{C}$  に 5 分間暴露することにより熱ショックを与えた。次に、各形質転換混合物に  $1.0 \mu\text{l}$  の YEB 培地を添加し、かつ該混合物を穏やかに振塗りつつ  $29^\circ\text{C}$  にて 2.5 時間インキュベートした。次いで、この細胞を室温にて小型遠心機で 30 秒間 ( $12,500 \text{rpm}$ ) 遠沈し、 $500 \mu\text{l}$  の YEB 培地に再懸濁し、3 種の  $100 \mu\text{l}$  の各形質転換された細胞懸濁液部分を  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシンおよび  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のカナマイシンを含む  
50

新たなYEB寒天プレート上に置いた。これらのプレートを37℃にて一夜インキュベートした。適当なプラスミド構築体を含む形質転換されたA. ツメファシエンスのクローンを、制限酵素地図および500 µg/mlのストレプトマイシンおよび50 µg/mlのカナマイシンを含む5 mlのYEBブロス (G. アンの上記文献参照) 中で29℃にて一夜育成した個々のコロニーからミニプレブ法により単離したプラスミドDNAのDNA配列決定により同定した。ここで同定した類の組み換えA. ツメファシエンスのクローンは、植物形質転換の分野で公知の方法により、多数の作物種、主として双子葉植物の形質転換に利用できる。

実施例 24 : 合成 AMP<sup>3</sup> 遺伝子を担持する組み換え Ti プラスミドを含む A. ツメファシエンス菌株によるタバコの葉盤 (leaf disc) の形質転換

A. ツメファシエンス菌株の担持する組み換え Ti プラスミドを使用した外来遺伝子によるタバコの形質転換は双子葉植物に耕種学的に興味のある1または複数のマーカー遺伝子を伝達するための一般的な方法となっている。非武装化した (即ち、非毒性の) Ti プラスミドを担持する A. ツメファシエンス菌株によるタバコ植物の標準的な形質転換法は詳述されている。そのような有効な方法の一つは、新たに切り取ったタバコ葉盤の形質転換である。該プラスミド DEPMYP300/Bin19B を担持するものとして実施例 23 に記載の如く同定された A. ツメファシエンス菌株 LBA4404 (A. ヘケマ (Hoekema) 等, Nature, 1983, 303, pp. 179-181) の任意の単離体はタバコ葉盤の形質転換に使用でき、該植物発現カセット DEPMYP300 を担持するトランスジェニックタバコ植物の樹立に導く。実施例 23 に記載の如く、この組み換え発現カセット構築体は組み換え Ti プラスミドを A. ツメファシエンス菌株 LBA4404 中に樹立するという最終的な目的のために、該非武装化したバイナリー Ti プラスミド pBin19B 中でサブクロニングされた。該菌株 LBA4404 はタバコを包含する多数の双子葉作物種の植物組織の形質転換を可能とする。

組み換えプラスミド DEPMYP300/Bin19B を含む A. ツメファシエンス菌株 LBA4404 によるタバコ葉盤の形質転換法は、R. B. ホルシュ (Horsch) 等の植物分子生物学マニュアル (Plant Molecular Biology Manual)、クルワーアカデミック社 (Kluwer Academic Publishers)、マサチューセッツ州、ボストン、1990 第5章第A節) における p. A5/3 の手順4 から始まる「葉盤形質転換 (Leaf Disc Transformation)」と題する文献に詳細に記載されている。しかし、R. B. ホルシュ (Horsch) 等の上記の文献の p. A5/4 における随意的工程13および16は、DEPMYP300/Bin19B により連続的に形質転換された数種の推定的トランスジェニックタバコ植物を樹立し、かつ該文献の工程16の例におけるように、該植物の存在を少なくとも1種の独立の手段により確認するのに利用される。推定的 (putative) トランスジェニックタバコ植物組織中への T-DNA の確認における間接的な生化学的な証拠は、アグロバクテリウムベクター pBin19B の T-DNA 部分によりコードされる nptII 遺伝子精製物の酵素的検出によっても得ることができ、ここではプロット法 (B. ライス (Reiss) 等, Gene, 1984, 30, pp. 211-218 および A. レイナーツ (Reynaerts) 等、植物分子生物学マニュアル (Plant Molecular Biology Manual)、クルワーアカデミック社 (Kluwer Academic Publishers)、マサチューセッツ州、ボストン、1990 第9章第A節) の pp. A9/7-8 における、選択可能なおよびスクリーニング可能なマーカー (Selectable and Screenable Markers) と題する論文) 中で放射性標識された ATP および未標識のカナマイシンを使用する。

本例で記載した方法により生成した推定的トランスジェニックタバコ植物中の該植物遺伝子発現カセット DEPMYP300 によりコードされる AMP<sup>3</sup> 融合遺伝子生成物の発現は、ノーザンハイブリダイゼーション分析を介してこの植物発現カセットにより形成される特定のメッセンジャー RNA (mRNA) の検出により間接的に確認できる。全 RNA は、T. C. バーウオード (Verwoerd) 等の RNA 単離法 (Nucleic

Acids Res., 1989, 17, p. 2362) をスケールアップした方法を使用して、タバコ葉盤形質転換開始後4~8週の推定的トランスジェニック植物から集めたタバコの葉の試料の小部分から単離した。簡単に言えば、テストすべき各植物から約10gの葉の組織を洗浄し、細断して50mlのベックマン(Beckman)の遠心機に入れ、液体窒素に入れ、そこで該植物組織を、ホモジナイズ用ドリルバイトまたは場合により該管の底部の形状に一致するプラスチックアダプタを備えた3/8インチのクラフツマン(CRAFTSMAN)コードレスドリル(イリノイ州、ジカゴのシアーズ、ローバック&社(Sears, Roebuck and Co.))を使用して、1~2分間穏やかに粉碎した。約25mlの予備加温した(80℃)抽出緩衝液([0.1MのLiCl、0.1MのTris-HCl、pH8.0、0.1MのNa<sub>2</sub>EDTA1.0%のドデシル硫酸ナトリウム]:フェノール=1:1;使用の直前に混合)を各粉碎した組織試料に加え、該試料を30秒間攪拌した。約12mlの24:1クロロフォルム:イソアミルアルコールを各管に添加し、該管を再度5~30秒間攪拌した。

次に、該管の内容物を、モデルGP遠心機(ベックマンインストルメンツ社(Beckman Instruments Inc.))、パロアルト、カリフォルニア州)で室温にて最高速度で30分間遠心処理し、各管の上部液体相を捨てた。等量の4MLiClと0.03%のジエチルピロカーボネートとを各管に添加(約20~25ml)し、該管を再度5~30秒間攪拌し、次いでこれらを4℃にて一夜放置した。該管を翌日最高速度で、卓上遠心機(ベックマンインストルメンツ社(Beckman Instruments Inc.))、パロアルト、カリフォルニア州)で30分間遠心し、得られた上澄を捨てた。得られたペレットを100%エタノール5~10mlで素早く濯ぎ、最高速度で、卓上遠心機にて5~30分間再度遠心処理した。

該エタノール上澄を各試料から除去し、各ペレットを0.1%のジエチルピロカーボネートと5μlのRNアシン(RNasin)阻害剤(ウイスコンシン州、マジソンのプロメガ社(Promega Corporation))とで予備処理した蒸留水5mlに再懸濁した。pH5.5の3M酢酸ナトリウム約500μlおよび2容の100%エタノール(-20℃)とを各RNA含有溶液に添加し、全ての試料を氷浴内で1.5~2時間保存した。次いで、該試料を最高速度で、卓上遠心機にて30分間遠心処理して、得られた上澄をすて、各ペレットを素早く100%エタノール(-20℃)1~5mlで濯ぎ、該試料を同一の条件下で再度遠心処理した。該上澄を再度捨て、各ペレットを0.1%のジエチルピロカーボネート予備処理した蒸留水5mlに再懸濁した。

各試料の濃度は1:400の希釈率で各試料を蒸留水で希釈したものについて、波長230、240、260、280および320nmにおける分光光度測定により決定した。光学密度比1.3~2.0の範囲の $A_{260}/A_{280}$ 、1.0未満の $A_{240}/A_{260}$ および $A_{230}/A_{260}$ および0.15未満の範囲内の $A_{320}/A_{260}$ は許容できるものとされ、より好ましい値は1.5~2.0の範囲 $A_{260}/A_{280}$ 、1.0未満の $A_{240}/A_{260}$ および $A_{230}/A_{260}$ および0.10未満の範囲内の $A_{320}/A_{260}$ であった。

各試料約110μgを、標準的ノーザンハイブリダイゼーションプロット法(cf. T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版), pp. 7.37-7.52; コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、NY, 1989)により変性ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動にかけ、公知の技術(T. マニアティス等、Molecular Cloning (第2版)、上記文献、pp. 7.49-7.50)に従って0.22μmのナイロン膜(MSIマサチューセッツ州、ウエストボロ)に転写した。実施例21に記載したように全DEPMYP300プラスミドDNAを標準的なニットトランスレーションキット(BRLギブコ(GIBCO)、ライフテクノロジー社(Life Technologies Inc.))メリーランド州、ガイザースブルグ)を使用して、製造業者の指示に従ってニットトランスレーションした。32p-標識したプラスミドDNAをセファデックスG-50クロマトグラフィー(T. マニアティス等、Molecular Cloning, p. 464; コールドスプリン

測定値として記録した。〔－〕は発芽が全く起こらなかったことを示し、〔＋〕は膨らんだ発芽管を有する膨張胞子を意味し、〔＋＋〕は全体としてルーズな格子の概観をもつ菌糸成長の開始を意味し、〔＋＋＋〕は全体として厚い不透明な網状組織の概観をもつ密な菌糸成長を意味する。次に、各ペプチドに対するMCIC値を記録した。このMCIC値は胞子発芽の生じない（ランク＝〔－〕）最低のペプチド濃度として定義される。

以下の表7には、各ペプチドに対する胞子発芽の程度を掲載したが、ここでペプチドNo. 1（この混合物では、比較的抗真菌性のペプチドである）の濃度がそのMCIC値と等しい。表7は、また混合物中の各ペプチドの濃度を同一にして、これらの抗生物質ペプチドを組み合わせた効果をも示す。

表 7

10

ペプチド濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )		
ペプチド No. 1	ペプチド No. 4	胞子発芽の程度
20	0	〔－〕
0	5	〔＋＋＋〕
20	5	〔－〕

これらのペプチドを別々に、あるいは組み合わせて使用した抗生物質バイオアッセイは実施例17に記載の如く実施した。テストすべき各ペプチド原液約7.5  $\mu\text{l}$ および7.5  $\mu\text{l}$ の水または第二のペプチドの原液を各実験用の同形培養物に対する該マイクロタイタプレート 20の単一のウェルに添加した。テストしたペプチド希釈物は以下に示す最終ペプチド濃度に対応した。

ペプチド No. 1				ペプチド No. 4			
原液濃度		最終濃度		原液濃度		最終濃度	
666.5	$\mu\text{g/ml}$	50	$\mu\text{g/ml}$	133.3	$\mu\text{g/ml}$	10	$\mu\text{g/ml}$
400	$\mu\text{g/ml}$	30	$\mu\text{g/ml}$	66.7	$\mu\text{g/ml}$	5	$\mu\text{g/ml}$
266.7	$\mu\text{g/ml}$	20	$\mu\text{g/ml}$	33.3	$\mu\text{g/ml}$	2.5	$\mu\text{g/ml}$
133.4	$\mu\text{g/ml}$	10	$\mu\text{g/ml}$	16.7	$\mu\text{g/ml}$	1.25	$\mu\text{g/ml}$
66.7	$\mu\text{g/ml}$	5	$\mu\text{g/ml}$	8.3	$\mu\text{g/ml}$	0.625	$\mu\text{g/ml}$
33.3	$\mu\text{g/ml}$	2.5	$\mu\text{g/ml}$	4.26	$\mu\text{g/ml}$	0.313	$\mu\text{g/ml}$
16.7	$\mu\text{g/ml}$	1.25	$\mu\text{g/ml}$	2.1	$\mu\text{g/ml}$	0.156	$\mu\text{g/ml}$
8.35	$\mu\text{g/ml}$	0.625	$\mu\text{g/ml}$	1.04	$\mu\text{g/ml}$	0.078	$\mu\text{g/ml}$
4.2	$\mu\text{g/ml}$	0.313	$\mu\text{g/ml}$	0.52	$\mu\text{g/ml}$	0.039	$\mu\text{g/ml}$
2.138	$\mu\text{g/ml}$	0.156	$\mu\text{g/ml}$	0.26	$\mu\text{g/ml}$	0.0195	$\mu\text{g/ml}$

30

該マイクロタイタプレートをパラフィルムで封止し、振盪台上で28℃にて44時間まで 40インキュベートした。各EccSR319培養ウェルの光学密度を20および44時間において記録した。次いで、最低完全阻害濃度(MCIC)をペプチドNo. 1およびペプチドNo. 4単独に対して測定した。以下の表8には、各ペプチドに暴露されたバクテリアの該マイクロタイタプレート中の単一のウェル中でのバクテリアの成長の%阻害率を示し、そこではペプチドNo. 4（この混合物中では比較的抗生物性のペプチドである）の濃度がそのMCIC値に等しい。表8は、また混合物中の各ペプチドの濃度を単独の場合と同一にして、これらの抗生物質ペプチドを組み合わせた効果をも示す。

表 8

ペプチド濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		バクテリア接種物成長の
ペプチド No. 1	ペプチド No. 4	阻害の程度 (%)
20	0	19
0	5	100
20	5	100

表7および8にまとめた結果を比較すると、ペプチドNo. 1に対して20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ およびペプチドNo. 4に対して5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度がこれら2種のペプチドの相補混合物に要求される要件を満たすことを理解でき、この組み合わせがバクテリアおよび真菌の植物病原体両者の成長を効果的に遅延することがわかる。

本発明の原理、好ましい態様および操作の様式を本明細書において記載してきた。しかし、保護さるべき本発明はここに記載の特定の態様に限定しようとするものではない。というのは、これら特定の態様は本発明を限定するのではなく、むしろ例示的なものであるからである。他の者にとっては、本発明の精神並びに範囲を逸脱することなしに種々の変更並びに置換が可能である。

#### 配列リスト

##### (1) 一般的情報

(i) 出願人：マペリ (Mapelli) Ph. D, クラウディオ (Claudio)

デロバーティス (DRobertis)、キャシー (Cathy)

スタール (Stahl)、ジェリー (Jerry)

スワードロフ (Swerdloff) Ph. D, ミカエル (Michael) D.

ウィリアム (William) Ph. D, ジョン (Jon) I

エベレット (Everett) Ph. D, ニコラス (Nicholas) P.

バスコム (Bascorb) Ph. D, ニューエル (Newell)

(ii) 発明の名称：特に植物病原体に対する保護用の、逆抗生物ペプチド、抗生物オリゴペプチドおよび他の抗生物組成物、およびその製造並びに使用法

(iii) 配列数：27

(iv) 通信用住所

(A) 受信人：レーナー (Lerner)、デービッド (David)、リッテンバーグ (Littenberg)、クラムホルツ (Krumholz) & メントリック (Mentlik)

(B) ストリート：600 サウスアベニュー (South Ave.), ウェストスート (West, Suite) 300

(C) シティ：ウェストフィールド (Westfield)

(D) 州：ニュージャージー (New Jersey)

(E) 国名：アメリカ合衆国

(F) ジップコード (ZIP)：07090

(v) コンピュータ読みだし形式

(A) 媒体型：フロッピーディスク

(B) コンビ：。ユータ：IBM PCコンバーチブル

(C) 作動システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントインリリース (Patent In Release) #1  
0、バージョン#1.25

(vi) 現出願日

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(viii) 代理人情報

(A) 名称：テシュナー E s q . , ミカエル (M i c h a e l) H

(B) 登録番号：32, 862

(C) 書類番号：エニモン (E n i m o n t) 3. 0-042

(i x) 通信情報

(A) 電話番号：908-654-5000

(B) ファックス番号：908-654-7866

(2) SEQ ID No. 1に関する情報；

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 1

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala Phe

1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Lys Ser

20

10

(2) SEQ ID No. 2に関する情報；

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 2

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala Phe

1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser

20

30

(2) SEQ ID No. 3に関する情報；

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 3

Gly Ile Gly Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ala Phe

1 5 10 15

Val Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa

40

(2) SEQ ID No. 4に関する情報；

(i) 配列特性

(A) 長さ：4アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

50

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 4

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

(2) SEQ ID No. 5に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：5 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

10

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

(2) SEQ ID No. 6に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：31 アミノ酸

20

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 6

Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys

1

5

10

15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Glu Gly Gly Pro Arg

20

25

30

30

(2) SEQ ID No. 7に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：21 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 7

Gly Met Ala Ser Lys Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Ile Ala Lys Val

1

5

10

15

40

Arg Leu Lys Ala Leu

20

(2) SEQ ID No. 8に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：37 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

50



(i i) 分子の型：ペプチド

(i x) 特徴

(A) 名称／キー名：変性－サイト (Modified-site)

(B) 位置：37

(D) 他の情報：注意＝C－末端アミノ酸はアミド形状にある。

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 8

Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Glu Lys Val Gly Gln Asn Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Asp Gly Ile Ile Lys Ala Gly Pro Ala Val Ala Val Val Gly Gln Ala  
 20 25 30  
 Thr Gln Ile Ala Lys  
 35

10

(2) SEQ ID No. 9に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

20

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 9

Ser Lys Met Ile Glu Gly Val Phe Ala Lys Gly Phe Lys Gly Ala Ser  
 1 5 10 15  
 His Leu Phe Lys Gly Ile Gly  
 20

(2) SEQ ID No. 10に関する情報：

30

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 10

Ser Asn Met Ile Glu Gly Val Phe Ala Lys Gly Phe Lys Lys Ala Ser  
 1 5 10 15  
 His Leu Phe Lys Gly Ile Gly  
 20

40

(2) SEQ ID No. 11に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：23アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 11

50

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Val Phe Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Lys Gly Ile Gly

20

(2) SEQ ID No. 12に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 23 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

10

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: ペプチド

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 12

Xaa Xaa Met Ile Glu Xaa Val Phe Ala Lys Xaa Phe Lys Xaa Ala Xaa

1 5 10 15

Xaa Leu Phe Lys Gly Ile Gly

20

(2) SEQ ID No. 13に関する情報:

20

(i) 配列特性

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: ペプチド

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 13

Arg Pro Gly Gly Gln Ile Ala Ile Ala Ile Gly Glu Ser Ile Arg Lys

1 5 10 15

Lys Ala Ser Asn Glu Leu Lys Lys Ala Thr Lys Ser Leu Trp Ser

30

20

25

30

(2) SEQ ID No. 14に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 37 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: ペプチド

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 14

40

Lys Ala Ile Gln Thr Ala Gln Gly Val Val Ala Val Ala Pro Gly Ala

1 5 10 15

Lys Ile Ile Gly Asp Arg Ile Asn Gln Gly Val Lys Glu Ile Lys Lys

20

25

30

Phe Leu Lys Trp Lys

35

(2) SEQ ID No. 15に関する情報:

50

(i) 配列特性

(A) 長さ：21 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 15

Leu Ala Lys Leu Ala Val Lys Ala Ile Lys Gly Ala Ile Ala Gly Ala

1 5 10 15

Lys Ser Ala Met Gly

10

20

(2) SEQ ID No. 16に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：12 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 16

Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Ala Tyr Ala Thr Ala

20

1 5 10

(2) SEQ ID No. 17に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：21 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 17

30

Arg Gln Ile Ile Val Phe Met Arg Lys Lys Asn Phe Val Thr Lys Ile

1 5 10 15

Leu Lys Lys Gln Arg

20

(2) SEQ ID No. 18に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：6 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) 形状：線状

(i i) 分子の型：ペプチド

(x i) 配列の記載：SEQ ID No. 18

40

Ala Lys Ser Arg Trp Tyr

1 5

(2) SEQ ID No. 19に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ：16 アミノ酸

50

- (B) 型：アミノ酸  
 (D) 形状：線状  
 (i i) 分子の型：ペプチド  
 (x i) 配列の記載：SEQ ID No. 19

Ile Gly Glu Asp Val Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp Ser Leu Arg  
 1 5 10 15

- (2) SEQ ID No. 20に関する情報：

- (i) 配列特性  
 (A) 長さ：23アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) 形状：線状  
 (i i) 分子の型：ペプチド  
 (x i) 配列の記載：SEQ ID No. 20

Gly Ile Gly Lys Phe Leu Arg Glu Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
 1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Lys Pro

20

- (2) SEQ ID NO. 21に関する情報：

- (i) 配列特性  
 (A) 長さ：32アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) 形状：線状  
 (i i) 分子の型：ペプチド  
 (x i) 配列の記載：SEQ ID No. 21

Met Gly Arg Ile Ala Arg Gly Ser Lys Met Ser Ser Leu Ile Val Ser  
 1 5 10 15

Leu Leu Val Val Leu Val Ser Leu Asn Leu Ala Ser Glu Thr Thr Ala  
 20 25 30

- (2) SEQ ID No. 22に関する情報：

- (i) 配列特性  
 (A) 長さ：28アミノ酸  
 (B) 型：アミノ酸  
 (D) 形状：線状  
 (i i) 分子の型：ペプチド  
 (x i) 配列の記載：SEQ ID No. 22

Met Gly Lys Asn Gly Ser Leu Cys Cys Phe Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ser Gly His Gln Val Leu  
 20 25

- (2) SEQ ID No. 23に関する情報：

(i) 配列特性

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: ペプチド

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 23

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

10

(2) SEQ ID No. 24 に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 87 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) ストランド型: 一本鎖

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: DNA (ゲノム)

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 24

CATGGGTATC GGTAAGTTC TCGCGAGGC TGGCAAGTTC GGCAAGGCCT TCGTGGCGA 60

20

GATCATGAAG CCTTAAGTCG ACCTGCA

87

(2) SEQ ID No. 25 に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 79 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) ストランド型: 一本鎖

(D) 形状: 線状

(i i) 分子の型: DNA (ゲノム)

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 25

30

GGTGGACTTA AGGCTTCATG ATCTCGCCCA CGAAGGCCTT GCCGAAGTTG CCAGCCTCGC 60

GCAGGAAGTT ACCGATACC

87

(2) SEQ ID No. 26 に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 156 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) ストランド型: 一本鎖

(D) 形状: 線状

40

(i i) 分子の型: DNA (ゲノム)

(x i) 配列の記載: SEQ ID No. 26

CATGGGTATC GGTAAGTTC TCGCGAGGC TGGCAAGTTC GGCAAGGCCT TCGTGGCGA 60

GATCATGAAG CCTGCTATCG GTAAGTTCCT CCGCGAGGCT GGCAAGTTCG GCAAGGCCTT 120

CGTGGCGGAG ATCATGAAGC CTTAAGTCGA CCTGCA

156

(2) SEQ ID No. 27 に関する情報:

(i) 配列特性

(A) 長さ: 148 塩基対

50

GGTCGACTTA AGGCTTCATG ATCTCGCCCA AGAAGGCCTT GCCGAAGTTG CCAGCCTCGC 60  
GCAGGAAGCTT ACCGATACCA GGCTTCATGA TCTCGCCAC GAAGGCCTTG CCGAAGTTGC 120  
CAGCCTCGCG CAGGAAGTTA CCGATACC 148

10

【図1】 好ましいペプチド、ペプチドモノマー、及びブリッジ、ならびにオリゴヌクレオチドを含む表であり、その総ては慣用の一文字表記で示されている。

【图 1】

[ 1 ]

```

362. ID HQ.          ^?^?K
1      GICKFLHSAGKFOKAFVGEDMKS
2      GICKFLHSAGKFOKAFVGEDMKS
3      GICKGTXAGKXGAFVGTXX
4      XGKX
5      XGKX
6      SHLXKXAGLHNSAKRISGIAIAIQCGPR
7      GHASGIGALAGHTAKVALKAL
8      KWLLPKT EKVGQNTKDGITKACPAVAVVQQTAK-NH2
9      SKKIGTVANGTZXGASBLFKGTS
10     SHKIGVTANGTZXGASBLFKGIS
11     XKXIGGVTAAGKXKXKXGKGTG
12     XKHIXVPAKKFPAKXKJFKGIG
13     PRGGGJALAIIGSIRKASHELKXATKSLWS
14     KAIQTAGGVVAVAPGAKIIGDRHQGVKKEPKPKKK
15     LAKLAVKAIKZACAKASANG
16     KNSLPKVALATA
17     KQIIVPRKQKQYPRKILKQR
18     AKSMY
19     IGEDVITTPGISGDSLR
20     GICKFLREAGKFGKAFVGEIMOP
21     KGRJANGKHSKSLTVSLAVLWLSNLABETTA
22     KRSKGLCTTFLLEALLAGLASGHQVL
23     GGGGSGGGGSGGGGS

      SLIGBUKLEDTTDS

24     CATGGCTATC GGTAACTTCC TCOCGAGCC
TCGCAAGCTT  GCGCAAGCTC TCGTGGCCGA
GATCATGAAG  CCTTAACTGC ACTTGA

25     GGTGCACTTA AGCCTTCATG ATCTGCGCCA
CGAAGGCGCT  GCGCAAGCTG CCAGCCTCGC
CGAGGAACCT  ACGGATACC

26     CATGGCTATC GGTAACTTCC TCOCGAGCCG
TCGCAAGCTT  GCGCAAGCTC TCGTGGCCGA
GATCATGAAG  CCTGGTATCC GTAACTTCTC
GCGCAGCACT  CGCAAGCTCT  CGAAGGCGCT
CTCGGCGGAG  ATCATGAAGC  CTAACTTGA
CCTGCA

27     GGTGCACTTA AGCCTTCATG ATCTGCGCCA
CGAAGGCGCT  GCGCAAGCTG CCAGCCTCGC
CGAGGAACCT  ACCGATACCA GCGTTCATCA
TCTCGGCCAC  GAAGGCGCTG  CGCAAGCTTC
CAGCCTCGCG  CAGGGAACCTA  CCGATACC

```

---

フロントページの続き

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(72)発明者 クラウディオ メイビリィ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08540プリンスストン デルメラー ドライヴ  
107

(72)発明者 キャサリン ダガス デ ロバーツ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08512克蘭ベリィ ウッド ミル ドラ  
イヴ 213

(72)発明者 ゲラルディン フランシス スタール

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08629トレントン リンデイル アベニュー  
1006

(72)発明者 ニューエル フレッド バスコム

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08648ロウレンスヴィル ガロ コート  
9

(72)発明者 マイケル デニス スウェドロフ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08540プリンスストン アルドゲート コート  
14

(72)発明者 ジョン アイラ ウィリアムス

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08691ロヴィンスヴィル ダーベル ドライ  
ヴ 11

(72)発明者 ニコラス ボール エバレット

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08534ベニングトン シティ バード ロ  
ード 292 ジェイ